

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

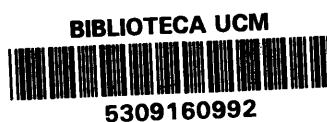
**Mecanismo de regulación de las hormonas pancreáticas
sobre la gluconeogénesis hepática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Isabel Jiménez García

Madrid, 2015

R. 504.330



• DE 612.35
JLM

TA 1783

MECANISMO DE REGULACIÓN DE LAS HORMONAS PANCREÁTICAS

=====

SOBRE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA

=====

Tesis presentada para optar al grado de

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

por

Ma ISABEL JIMÉNEZ GARCÍA

Madrid, 1974



Biblioteca
de Medicina



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Metabolismo del Instituto Marañón del C.S.I.C., a cuyos miembros deseo agradecer su compañerismo y cooperación.

Al Dr. R. Parrilla, que con sus conocimientos y capacidad de trabajo ha sido a la vez un excelente director y un gran amigo.

A la Dra. M. S. Ayuso-Parrilla, que en tantas ocasiones me ha ayudado, estando siempre dispuesta a comunicar sus ideas y experiencia.

Mi afectuoso recuerdo al Dr. P. Gómez-Leal, que siempre me ha estimulado a continuar mi carrera académica.

Y a D. Tomás Fontela Casado y al Servicio de Instrumentación del C.I.B. que con su entusiasmo y competencia han hecho posible la rápida ejecución de éste trabajo.

Esta tesis ha sido posible gracias a la generosa ayuda de los laboratorios Lilly Indiana S.A. y, en parte, por una ayuda de Investigación de la Comisión Asesora para el Desarrollo de la Investigación.

Madrid, Noviembre de 1.974.

I N D I C E
=====

ABREVIATURAS Y ENZIMAS	1
INTRODUCCIÓN	6
1. Breve reseña histórica	7
2. El glucagón como hormona catabólica	9
3. Interrelación de glucagón con insulina y otras hormonas	11
4. Visión actual del papel del glucagón en la homeostasis de la glucosa	14
5. Gluconeogénesis hepática y su regulación	15
a) Glucogenolisis	16
b) Gluconeogénesis	17
6. El hígado aislado y perfundido como modelo experimental	22
7. Planteamiento experimental y objetivos de esta tesis	24
MATERIAL Y MÉTODOS	28
1. Animales	29
2. Reactivos	29
3. Técnica de perfusión	29
4. Técnica operatoria	32
5. Control bacteriológico	35
6. Comportamiento funcional del hígado aislado y perfundido	36
7. Proceder experimental	38
8. Métodos analíticos	40

a) Medio de perfusión	40
b) Tratamiento del tejido	40
c) Extracción de metabolitos	41
d) Medición de metabolitos	41
e) Medida del consumo de oxígeno	44
9. Cálculo y expresión de resultados	44
RESULTADOS	46
1. Efectos de glucagón y de glucagón - más insulina sobre el metabolismo - hepático de L-Lactato sódico (10mM)	47
a) Cambios en el medio de perfusión	47
b) Intermediarios de gluconeogénesis	55
c) Intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos	60
d) Nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno	60
2. Efectos de glucagón y de glucagón - más insulina sobre el metabolismo hepático de L-Alanina (10 mM)	64
a) Cambios en el medio de perfusión	66
b) Intermediarios de gluconeogénesis	74
c) Intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos	76
d) Nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno	80
3. Efectos de glucagón y de glucagón -	

más insulina sobre los cocientes de acción de masas de alanina y aspartato-aminotransferasas	82
4. Cambios en el estado de oxidorreducción celular inducidos por glucagón y por glucagón más insulina	89
5. Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración celular de CoA y derivados acyl-CoA	98
6. Efectos hormonales sobre la distribución intracelular de metabolitos	102
a) Procedimiento de cálculo de la distribución intracelular de metabolitos	103
b) Distribución intracelular de metabolitos en hígados perfundidos con L-Lactato	110
c) Distribución intracelular de metabolitos en hígados perfundidos con L-Alanina	113
7. Efectos hormonales sobre la captación de potasio	119
DISCUSIÓN	122
Significación fisiológica del efecto gluconeogénico del glucagón	123
Control de la gluconeogénesis	125

Papel regulador del transporte de amino	
nes	134
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	143
Consideraciones en torno al mecanismo	
de acción del glucagón	146
CONCLUSIONES	150
BIBLIOGRAFÍA	154

- o - o - o -

ABREVIATURAS Y ENZIMAS
=====

ABREVIATURAS

AcAc	Acetoacetato
Ala	Alanina
AMP, ADP, ATP	5'-Mono-, di- y trifosfato de adenosina
Asp	Aspartato
Cit	Citrato
Cit.	Citosol
Citrul	Citrulina
CoA	Coenzima A
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacetico
EM	Enzima málico
F-6-P	Fructosa-6-Fosfato
FdiP	Fructosa di-fosfato
G-1-P	Glucosa-1-Fosfato
G-6-P	Glucosa-6-Fosfato
GAD	Gliceraldehido
GAP	Gliceraldehido-fosfato
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Glut	Glutamato
α -GOP	α -Glicerofosfato
GOT	Glutámico oxalacético transaminasa
GPT	Glutámico pirúvico transaminasa
GTP	Tri-fosfato de guanosina
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
Isocit	Isocitrato
α -KG	α -Cetoglutarato
Lact	Lactato

LDH	Láctico-deshidrogenasa
Mal	Malato
MDH	Malato-deshidrogenasa
Mit.	Mitocondria
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinam. adenina dinucleótido (for. red.)
OAA	Oxalacetato
β -OHB	β -hidroxibutirato
β -OHB ₂ DH	β -hidroxibutirato deshidrogenasa
P.C.	Peso Corporal
PEP	Fosfoenolpyruvato
3-PGA	3-Fosfoglycerato
Pyr	Pyruvato
Suc	Succinato
Triosa-P	Triosa fosfato (dihidroxiacetona-P + GAP)

ENZIMAS

<u>Nombre Común</u>	<u>Nombre sistemático</u>	<u>Número E.C.</u>
Adenylato-ki- nasa	ATP:AMP phosphotrans- ferase	2.7.4.3
Alanina deshi- drogenasa	L-Alanine:NAD oxido- reductase(deaminating)	1.4.1.1
Aldolasa	Fructose-1,6-Diphos- phate D-glyceroaldehy- de-3-phosphate-liase	4.1.2.13
Citrato sinte- tasa	Citrate oxalacetate- -lyase (CoA-acetyla- ting)	4.1.3.7
Enzima málico	L-Malate:NADP (oxidore- ductase (decarboxila- ting)	1.1.1.40
Fosfoenolpyru- vato-carboxi- kinasa	GTP:oxalacetato carbo- xy-ligasa (Transphos- phorilating)	4.1.1.32
Fosfofructoki- nasa	ATP:D-fructose-6-phos- phate 1-phosphotrans- ferase	2.7.1.11
3-Fosfoglice- rokinasa	ATP:3-phospho-D-glyce- rato-1-phosphotransfe- rase	2.7.2.3
Fructosa di- fosfatasa	D-Fructose-1,6 Diphos- phate 1-phosphohydro- lase	3.1.3.11
Gliceraldehi- do-deshidroge- nasa	D-Glyceroaldehido 3- -phosphate:NAD oxido- reductase (phosphori- lating)	1.2.1.12

<u>Nombre común</u>	<u>Nombre sistemático</u>	<u>Número E.C.</u>
α-glicerofosfato deshidrogenasa	L-glycerol-3-phosphate:NAD oxidoreductase	1.1.1.8
Glucosa-6-fosfatasa	D-Glucose-6-Phosphate phosphohydrolase	3.1.3.9
Glutamato deshidrogenasa	L-Glutamate:NAD oxidoreductase (deaminating)	1.4.1.2
Glutámico pirúvico transaminasa	L-Alanine:2-oxoglutarate aminotransferase	2.6.1.2
β-hidroxi-butarato deshidrogenasa	D-3-hydroxybutyrate:NAD oxidoreductase	1.1.1.30
Isocitrato - deshidrogenasa	Threo-Ds-Isocitrate:NADP oxidoreductase (decarboxylating)	1.1.1.40
Láctico deshidrogenasa	L-Lactate:NAD oxidoreductase	1.1.1.27
Malato deshidrogenasa	L-Malate:NAD oxidoreductase	1.1.1.37
Pyruvato carboxilasa	Pyruvate:carbon dioxide ligase (ATP)	6.4.1.1
Pyruvato deshidrogenasa	Pyruvate: lipoate - oxidoreductase (acceptor-acetylating)	1.2.4.1
Pyruvato-kinasa	ATP:Pyruvate phosphotransferase	2.7.1.40
Succinato deshidrogenasa	Succinato (acceptor) oxidoreductase	1.3.99.1

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

1.- Breve reseña historica.-

Banting y Best (1921) pudieron observar que la administración de sus primeros extractos pancreáticos a perros diabéticos producía sistemáticamente un leve aumento de la glucemia antes del esperado efecto hipoglucemiante. Otros autores como Collip (1923) también observaron este fenómeno pero no supieron interpretarlo correctamente. Fueron Murlin y sus colaboradores (Murlin y col., 1923; Kimball y Murlin, 1923) quienes postularon la existencia en las preparaciones de insulina de algún factor pancreático de propiedades hiperglucemiantes. Esta sustancia fue denominada por éstos autores glucagón en vista de sus aparentes propiedades movilizadoras de glucosa.

Los postulados de Murlin no resultaron ampliamente convincentes a pesar de que pudo comprobarse (Lundsgaard y col., 1939) que no todos los preparados de insulina producían la referida hiperglicemia inicial tras su administración, lo que sugería la presencia esporádica de algún contaminante.

Las posibles dudas sobre la naturaleza hormonal del factor hiperglucemiante pancreático quedaron resueltas al llegarse a conseguir su aislamiento, purificación y cristalización (Staub y col., 1953, 1955) seguido de su estudio estructural (Bromer y col., 1956) y su ulterior síntesis (Wunsch y col., 1968).

Tras más de veinte años desde el descubrimiento de esta hormona se ha acumulado una cantidad ingente de información sobre su síntesis, secreción y efectos fisiológicos, a pesar de lo cual su mecanismo de acción y su papel fisiológico en las distintas especies animales permanece bastante oscuro. De todos los efectos descritos del glucagón (sobre el balance iónico, metabolismo de lípidos, catabolismo protéico, etc.) sin duda el que ha merecido mayor atención es su papel regulador sobre el metabolismo hidrocarbonado. Desde los orígenes de su descubrimiento se quiso ver en el glucagón la substancia capaz de oponerse a los efectos hipoglucemiantes de la insulina de forma tal que sería crítica la existencia de un adecuado balance entre las dos hormonas para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

La observación de Sutherland y Robinson (1969) sobre el papel del AMP-cíclico como mediador del efecto glucogenolítico del glucagón y del papel de este nucleótido cíclico como segundo mensajero o "mensajero intracelular" - del efecto hormonal, acaparó gran atención minimizando así la acción gluconeogénica de la hormona.

En los últimos cinco años, quizás debido a un conocimiento más amplio de los mecanismos por los cuales el glucagón produce glucogenolisis, se ha venido prestando atención prioritaria a su efecto gluconeogénico. Quizás una de las primeras observaciones de que el glucagón aumen

ta la producción hepática de glucosa, no sólo como consecuencia de su efecto movilizador de glucógeno, sino también sintetizando glucosa de novo, deba ser atribuido a Miller (1960). Este autor utilizó una preparación de hígado aislado y perfundido como modelo experimental. Este modelo ha sido utilizado posteriormente por diversos autores para estudiar el papel regulador del glucagón sobre la gluconeogénesis hepática a partir de diversos substratos. Schimassek y Mitzkat (1963) lo usaron con lactato sódico como substrato, Exton y col., (1966) con piruvato, García y col., (1966) y Mallette y col., (1969) con alanina, Ross y col., (1967) con diversos substratos. Señalamos estas citas bibliográficas porque se trata de autores que, de una u otra forma, han sido pioneros en el estudio de este problema.

2.- El Glucagón como hormona catabólica.-

Tybergheim (1953) fue el primero en observar que la administración in vivo de glucagón producía un aumento de la urea circulante. La corroboración de este efecto por Miller (1960) usando su preparación de hígado perfundido le llevó a hipotetizar que el glucagón podría jugar un papel crucial en los procesos catabólicos en el animal intacto. Esta hipótesis vendría respaldada por otras observaciones en las que el glucagón a dosis farmacológicas, in vivo, parecía incrementar el catabolismo protéico (Sâltter y col. 1957; Izzo y col., 1957; Ezrin y col., 1958). Observaciones más recientes confirman este punto en lo que a los

efectos ureogénicos y cetogénicos se refiere (Parrilla y col., 1972). En el incremento del catabolismo de aminoácidos a que parece dar lugar la hormona no parecen jugar ningún papel variaciones en el ritmo de síntesis de proteínas (Ayuso-Parrilla y Parrilla, 1973).

Respecto al metabolismo graso, el glucagón, se comporta como una hormona lipolítica, es decir, favorece la liberación de glicerol y ácidos grasos libres del tejido adiposo. Este efecto pudo ser puesto de manifiesto en diversas especies, principalmente en la rata (Steimberg y col., 1959; Rodbell y Jones, 1966; Lefebvre, 1966 etc. etc) y en aves (Goodridge y Ball, 1965; Prigge y Grande, 1971; etc.). Que este efecto lipolítico es directo sobre el tejido adiposo y no secundario a otras alteraciones hormonales o perturbaciones metabólicas lo prueba el hecho de ser abolido por anticuerpos antiglucagón tanto en mamíferos (Grey y col., 1970) como en aves (Langslow y Hales, 1970). Este efecto lipolítico parece también estar de alguna forma mediado por AMP-cíclico como lo sugiere la correlación entre efecto lipolítico y la acumulación intracelular de este nucleótido (Butcher y col., 1965). El efecto del nucleótido parece ser activando en forma aún no del todo establecida una triglicerido-lipasa (Weinges y Löffler, 1965). Los efectos del glucagón sobre el metabolismo hepático de lípidos dista de estar aclarado y mucho menos aún la interdependencia de metabolismo hidrocarbonado y lípidico como

respuesta a la hormona.

3.- Interrelación de glucagón con insulina y otras hormonas.-

La comprensión del mecanismo de acción del glucagón y su papel fisiológico se ve bastante dificultado por la estrecha interdependencia que muestra con otras hormonas. Como ejemplos recordemos, entre otros, el conocido efecto del glucagón liberando aminas simpaticomiméticas (Scian, 1960), o sobre la secreción de insulina (Samols, 1965). Asimismo la hipoglucemia insulínica (Foa y col., 1952; Ohneda y col., 1969) y los corticosteroides (Marco y col., 1973) son estimulantes de la secreción del glucagón. Particularmente tiene interés el hecho de que los animales adrenalectomizados no son sensibles al glucagón (Exton y col., 1966; Eisenstein y Strack, 1968), lo que quizás pudiera explicar el por qué estos animales muestran una intolerancia total al ayuno que se manifiesta en forma de hipoglucemia profunda. La mayor parte de los datos sobre interrelaciones hormonales son difíciles de valorar debido a la casi imposibilidad de extrapolar los datos experimentales a la situación normal o fisiológica. Así, por ejemplo, es posible que efectos como los descritos sobre el metabolismo de calcio y fósforo a través de alteraciones en la secreción de parathormona o el referido efecto sobre aminas simpaticomiméticas, entre otros, tengan escaso valor fisiológico y deban de ser valorados más en el terreno de la -

farmacología que en el de la fisiología.

La interrelación de glucagón e insulina es quizás sobre lo que se poseen mayor número de observaciones y también es la que goza de mayor base experimental para poder valorar su importancia fisiológica. Bajo un punto de vista fisiológico el interés de esta interrelación viene expresado porque el balance de estas dos hormonas puede jugar un papel importantísimo en la producción hepática de glucosa. Este punto de vista se apoya en diversas observaciones: En aquellas situaciones en las que existe una mayor demanda de glucosa por aquellos tejidos que la utilizan como principal fuente de energía la gluconeogénesis hepática se ve consiguientemente incrementada, dando lugar paralelamente a cambios en los niveles circulantes de insulina y glucagón caracterizados por una disminución de insulina y un aumento de glucagón. De este tipo de situación dan cuenta por ejemplo el ayuno (Aguilar-Parada y col., 1969) o el ejercicio (Böttger y col., 1971); situaciones, ambas, caracterizadas por incremento de la demanda gluconeogénica y movilización de substratos endógenos. Experimentalmente, desde la ya citada observación de Foa y col., (1952), han aparecido numerosos trabajos no sólo con animales de experimentación sino también con humanos, confirmando estas observaciones (Unger y col., 1962; Ohneda y col., 1969; Buchanan y col., 1969). De igual manera situaciones patológicas, como la diabetes, caracterizadas por la hiper

producción de glucosa, van invariablemente acompañadas de un aumento del glucagón circulante (Unger y col., 1970).

Por el contrario, tras la ingestión de alimento - rico en carbohidratos (Müller y col., 1970) o tras la administración intravenosa de glucosa (Ohneda y col., 1969), situaciones caracterizadas por la inhibición de la función gluconeogénica, se produce un cambio en la concentración de ambas hormonas de sentido opuesto al anteriormente descrito, es decir, aumento de insulina y disminución de glucagón.

El mecanismo por el cual tienen lugar estas variaciones de los niveles hormonales dista mucho de estar aclarado y no nos extenderemos en su análisis dado que es es capa de la intencionalidad de este trabajo. Digamos tan sólo que prevalecen dos criterios de interpretación que, dicho sea de paso, no creemos sean absolutamente incompatibles entre sí. Para Unger y col. (Ohneda y col., 1969) es crucial el papel regulador de los niveles de glucosa en contacto con las células insulares. En otras palabras, una variación en los niveles de glucosa traería como resultado un cambio simultáneo y de sentido opuesto en la liberación de ambas hormonas; serían, pues, dos sistemas independientes regulados por la glucosa. Para Samols y col. (Samols, 1965; Samols y col., 1969) serían dos sistemas interdependientes, pues la liberación de insulina estaría estrechamente controlada por las variaciones en la concentración de glucagón en las proximidades de las células β .

Para este mismo autor, la insulina podría asimismo ejercer un control directo sobre la liberación de glucagón almacenado en las células α (Samols y col., 1971).

4.- Visión actual del papel fisiológico del glucagón e insulina en la homeostasis de glucosa.-

Como hemos podido ver hasta ahora, las situaciones caracterizadas por disminución del aporte energético al organismo (ayuno) o de mayor consumo de substratos energéticos (ejercicio) van invariablemente acompañados de un aumento en la relación [Glucagón] / [Insulina] del plasma. Por el contrario las situaciones de abundancia en combustibles orgánicos se caracterizan por una disminución de este cociente que favorecería los procesos anabólicos. Teleológicamente se interpretan estos cambios como los más favorables para determinar la dirección y flujo que han de llevar los combustibles orgánicos en cada situación fisiológica. El sistema nervioso central utiliza glucosa como fundamental fuente de energía. Los cambios adaptativos para utilizar otros combustibles son lentos y probablemente insuficientes. Se comprende, pues, la importancia de un adecuado sistema de regulación de gluconeogénesis para la supervivencia de las especies.

La disminución del cociente [Glucagón] / [Insulina] en las épocas de abundancia favorecería el transporte de glucosa y su almacenamiento en hígado y músculo para los períodos de carestía. Los cambios en dirección opues-

ta darían lugar a la movilización de glucosa almacenada en forma de glucógeno y la movilización de aminoácidos (fundamentalmente a partir de proteína muscular) para gluconeogénesis. Esta visión de conjunto del papel coordinado de estas hormonas se ve apoyado por las observaciones de que en humanos, durante el ayuno, aumenta la liberación muscular de aminoácidos y simultáneamente su captación por el hígado (Cahill, 1970). Asimismo el efecto estimulante de aminoácidos sobre la secreción de glucagón (Assan y col., 1967) es casi abolido con la administración simultánea de glucosa (Müller y col., 1970); mientras que en situaciones de hiperactividad gluconeogénica (dieta pobre en carbohidratos) la ingestión de dieta rica en proteína da lugar a una hipersecreción de glucagón con escasos cambios en los niveles de insulina (Müller y col., 1971).

5.- Gluconeogénesis hepática y su regulación.

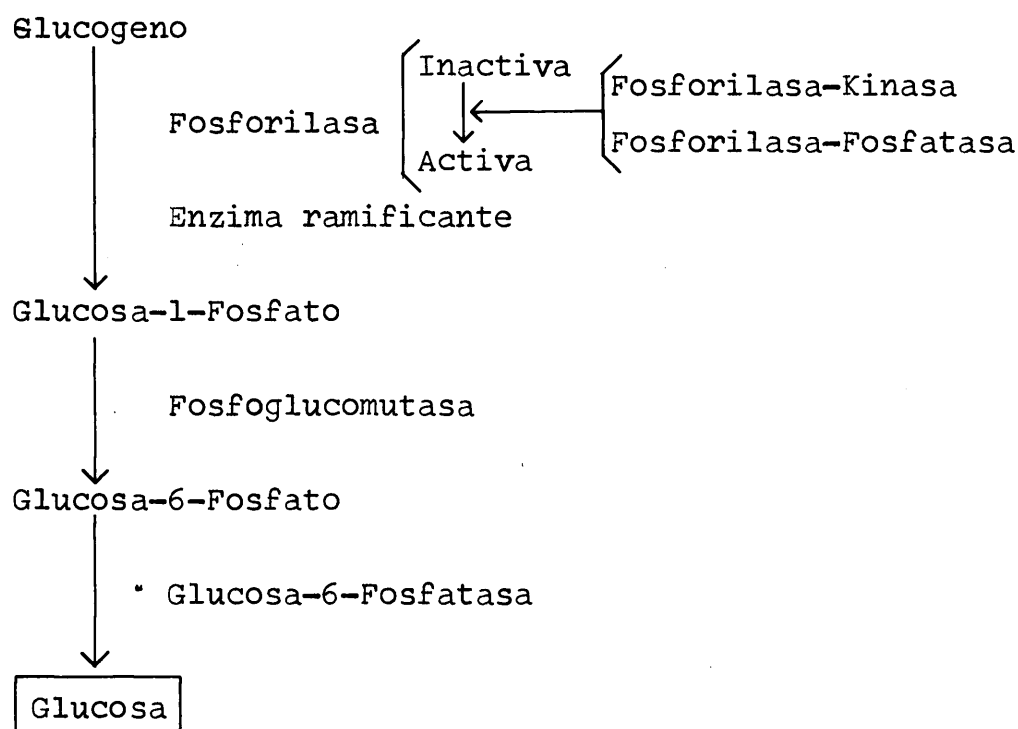
Tras haber analizado las bases fisiológicas que relacionan la producción de glucosa con niveles hormonales, analicemos a través de qué mecanismos puede tener lugar este control.

La producción hepática de glucosa puede aumentar - como consecuencia de una movilización acelerada de glucógeno o debido a un aumento en la síntesis de glucosa a partir de esqueletos carbonados de aminoácidos u otras moléculas orgánicas. Mientras existen reservas de glucógeno ambos procesos tienen lugar al tiempo (Parrilla y Toews, 1974)

Las reservas de glucógeno de un organismo cualquiera son - muy limitadas dado que su fuerte hidrófilia hace antieconómico su almacenamiento como combustible orgánico. Tiene, pues, carácter de combustible de "urgencia", en tanto mecanismos más útiles, como la gluconeogénesis, se adaptan para alcanzar su máxima eficacia.

a) Glucogenolisis.-

La secuencia de reacciones que dan lugar a la liberación de glucosa es la siguiente:



Desde los primitivos trabajos de Sutherland (1950) sabemos que la reacción de la fosforilasa es la etapa limitante de este proceso. Si admitimos que el efecto del glu

cagón es invariablemente mediado por AMP-cíclico, esta etapa sería sobre la que ejerce su control esta hormona.

El mecanismo íntimo por el que el glucagón y/o el AMP-cíclico activan la fosforilasa hepática dista de estar absolutamente aclarado; pero se cree que las cosas ocurren de la siguiente forma:

- 1) AMP-cíclico activaría protein-quinasas (Langan 1968; Kumon y col., 1970)
- 2) Protein-quinasas transformarían, mediante su fosforilación, una fosforilasa-kinasa inactiva en activa (Rall y col., 1956).
- 3) Fosforilasa-kinasa, catalizaría la conversión de fosforilasa inactiva en activa.
- 4) Existe una fosforilasa fosfatasa que transformaría la fosforilasa activa en inactiva (Wosilait y Sutherland, 1956). Parece que también existen formas activas e inactivas de este enzima.

La estimulación de la glucogenolisis por el glucagón se acompañaría de simultánea inhibición de la síntesis de glucógeno (Bishop y Larner, 1967).

Esta inhibición supone un ahorro de energía cuyo gasto sería inútil. El mecanismo parece ser una inhibición de la actividad glucógeno-sintetasa por medio de una sintetasa-kinasa en forma similar a como ocurre con la fosforilasa (Larner y Villar-Palasi, 1971).

b) Gluconeogénesis.-

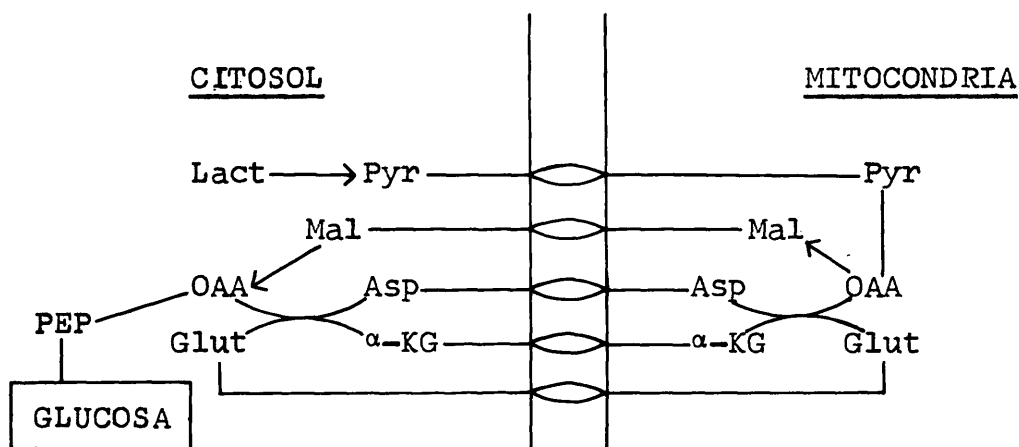
Cuantitativamente los substratos gluconeogénéticos

más importantes son lactato, pyruvato, y aminoácidos. El lactato y pyruvato provendrían de la glucolisis, fundamentalmente muscular. De esta forma los residuos de la oxidación incompleta de la glucosa en los tejidos primordialmente glicolíticos volverían al hígado para ser aprovechados en la síntesis de nuevas moléculas de glucosa. Esto es lo que se conoce con el nombre de "ciclo de Cori". Es obvio que este ciclo no da lugar a formación neta de glucosa puesto que utiliza como esqueletos carbonados residuos de glucosa preexistente. La neoformación de glucosa tiene lugar, pues, principalmente, a partir de aminoácidos, de ahí la utilidad de una coordinación entre la necesidad de incrementar la producción de glucosa y la movilización de aminoácidos a partir de proteínas tisulares.

La neoformación de glucosa no puede tener lugar como una simple reversión de las etapas de glucolisis, ya que algunas de sus etapas son termodinámicamente irreversibles debido al acusado cambio de energía libre standard. De esta forma, la transformación de pyruvato en fosfoenolpyruvato no puede tener lugar mediante pyruvato-kinasa (ATP: Pyruvate Phosphotransferase 2.7.1.40) cuya $\Delta G^{\circ} = + 7,5 \text{ Kcal.}$) sino que tiene lugar mediante la siguiente ruta alternativa: Carboxilación intramitocondrial de pyruvato (pyruvato: carbon-dióxido ligasa (ATP) 6.4.1.1) para formar oxalacetato; salida de oxalacetato al citosol como malato o aspartato (Lardy y col., 1965) que regenerando oxalacetato mediante deshidrogenación o transaminación será utilizado para la síntesis de fosfoe-

nol-pyruvato mediante el enzima fosfoenolpyruvato-carboxi-
kinasa (GTP: oxalacetato carboxy-ligasa (Transphosphorila-
ting) 4.1.1.32).

Esta secuencia se detalla esquemáticamente a conti-
nuación:



El transporte de estos aniones a través de la mem-
brana mitocondrial tiene lugar mediante sistemas específi-
cos para cada uno de ellos lo que plantea que esta etapa
pudiera ser limitante adquiriendo así importancia regulado-
ra en el proceso de síntesis de glucosa.

La segunda etapa de la secuencia glucolítica esen-
cialmente irreversible, es fosfofructokinasa (ATP : D-fruc-
tose-6-phosphate 1-phosphotransferase 2.7.1.11) cuya ΔG°
es de 3,4 Kcal. Durante el proceso de síntesis de glucosa
esta etapa es salvada mediante el enzima fructosa difosfa-
tasa (D-fructose-1,6-Diphosphate 1-phosphohydrolase 3.1. -
3.11).

Finalmente, la irreversibilidad de la reacción de
hexokinasa ($\Delta G^{\circ} = + 4,0$ Kcal) es obviada mediante el enzi

ma glucosa-6-fosfatasa (D-Glucose-6-Phosphate phosphohydro_lase 3.1.3.9).

Las variaciones en el flujo gluconeogénico pueden tener lugar a través de variaciones en la cantidad de enzima o de su actividad; asimismo debe considerarse la disminución de actividad glucolítica. Las variaciones en cantidad de enzima no parece probable que jueguen ningún papel en situaciones agudas. El aumento de flujo en una vía metabólica debemos recordar sólo puede tener lugar en aquellas reacciones que no se hallen en equilibrio termodinámico. Este se puede determinar comparando el cociente de acción de masas determinado experimentalmente (T) con la constante de equilibrio aparente (K_{eq}) o cociente de acción de masas en situación de equilibrio. Una reacción se ha definido arbitrariamente como de no equilibrio cuando T es tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la K_{eq} , es decir, $T/K_{eq} < 10^{-3}$, mientras que reacciones de equilibrio $T/K_{eq} > 0,2$ (Bucher y col., 1964; Rolleston, 1966).

No sólo una reacción enzimática puede ser importante en el control del flujo en una vía metabólica; así, por ejemplo, aunque en la gluconeogénesis a partir de alanina la carboxilación de piruvato es la primera reacción enzimática de no equilibrio, la primera etapa de control no es esta sino el transporte de alanina al interior de la célula (Malette y col., 1969 a); Malette y col., 1969 b). La complejidad del control de la actividad de una vía meta

bólica es considerable y las más de las veces debemos esperar que el control se ejerza mediante la acción coordinada a varios niveles.

El mecanismo por el cual el glucagón ejerce control sobre gluconeogénesis se desconoce. La similitud de cambios en hígados tratados con glucagón y con AMP-cíclico ha hecho pensar que este último es el mediador intracelular del efecto de la hormona, tal y como había sido postulado por Sutherland (1968). La ausencia de efecto estimulador de glucagón empleando substratos como glicerol, dihidroxiacetona o fructosa (Exton y Park, 1969) hizo pensar que el glucagón no tendría ningún efecto sobre aquellas etapas situadas por encima de triosa fosfato. Este punto actualmente ha sido puesto en duda a la vista de recientes publicaciones (Veneziale, 1971; Blair y col., 1973; Veneziale, 1972). Se ha considerado como de particular importancia en el efecto del glucagón las reacciones catalizadas por piruvato carboxilasa (Willianson y col., 1969) y por fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Exton y Park, 1969). También se ha analizado con interés (Willianson, 1967) la idea originalmente propuesta por Struck, en 1965, según la cual la activación de gluconeogénesis sería secundaria a un aumento de la lipólisis. También se ha especulado con el posible papel regulador del glucagón a través de sus efectos sobre el metabolismo de K^+ y de calcio (Friedmann y Park, 1968, Willianson y col., 1969).

Miller, en 1965, fué quizás el primero en aportar evidencia experimental sobre el antagonismo insulina-glucagón. Quizás esto sea demasiado simplista, pero en la actualidad este antagonismo se plantea por algunos autores, únicamente en términos de como actúa la insulina disminuyendo los niveles de AMP-cíclico. Lewis y col. (1971) han podido establecer una correlación entre el efecto de la insulina disminuyendo los niveles de AMP-cíclico y la inhibición del efecto gluconeogénico del glucagón. En cual --quier caso no existen pruebas concluyentes del mecanismo de acción de este antagonismo. Su importancia viene dada por el hecho de que concentraciones de insulina en el rango fisiológico (Mackrell y Sokal, 1969; Parrilla y col., 1974b) con proporciones [Glucagón] / [Insulina] del orden de las encontradas en la vena porta, revierten el efecto gluconeogénico del glucagón.

6.- El hígado aislado y perfundido como modelo experimental.-

El animal intacto como modelo experimental es demasiado complejo y técnicamente plantea también barreras --prácticamente insalvables.

El aislamiento de un órgano y el estudio de su actividad funcional es necesariamente artefactual, pero facilita la posibilidad de obtener información en condiciones controladas. La mayor o menor validez fisiológica de las

observaciones dependerá en gran medida de la tecnología utilizada. Las preparaciones de cortes de tejidos para el estudio del metabolismo hepático plantean el problema de que su oxigenación depende del grosor del corte; esto implica - que dada la falta de garantía en la homogeneidad de los cortes, la reproductibilidad de las observaciones puede resultar un serio problema.

Las células hepáticas aisladas ofrecen un modelo experimental que actualmente esta siendo muy empleado. Las principales ventajas son las de poder hacer estudios cinéticos dada la posibilidad de tomar diversas muestras de una misma preparación. Las objeciones al modelo vienen dadas - porque la digestión proteolítica del estroma durante el proceso de liberación celular parece que puede alterar receptores de la membrana plasmática teniendo como consecuencia - una respuesta no siempre reproducible a efectos hormonales. Este inconveniente parecer estar casi obviado mediante una serie de recursos técnicos que no pasamos a detallar. Fi - nalmente, queremos hacer notar que las preparaciones de cé - lulas aisladas sólo contienen células parenquimatosas (Be - rry y Friend, 1969). Esto implica que, al eliminar el res - to de los tipos celulares y sus posibles interacciones, los resultados, metabólicamente hablando, pueden no ser repre - sentativos de la totalidad. En este sentido la combinación de este sistema con el de hígado aislado y perfundido puede en ocasiones ser una opción más útil para determinados estu

dios metabólicos. (Parrilla y col., 1974a).

La utilización de 'órganos perfundidos como modelo experimental se remonta a 1849 (ver Jacobj 1890). Es clásica la observación de Bernard (1855) quien pudo detectar la aparición de glucosa en el efluente de un hígado de perro perfundido con agua. Jacobj publicó en 1898 un detallado trabajo sobre un aparato para perfusión de órganos aislados y en el mismo año Salaskin publicaba sus hallazgos sobre síntesis de urea en hígados aislados de perro. Desde comienzos del siglo actual son numerosos los trabajos realizados con esta preparación. Debemos destacar la importante aportación de Kestens (1964) por sus innovaciones técnicas.

Corey y Britton (1941) fueron los primeros en utilizar el hígado de rata en sus experimentos; pero hubieron de pasar varios años (Brauer y col., 1951; Miller y col., 1951) antes de que la preparación fuera mejorada técnicamente y demostrara su utilidad en investigación bioquímica. En la actualidad con diversas modalidades técnicas, es una técnica indispensable y de uso rutinario en la mayor parte de los laboratorios de metabolismo.

7.- Planteamiento experimental y objetivos de esta tesis.-

Los objetivos primordiales de esta tesis han sido el estudio de:

a) Mecanismo íntimo por el cual el glucagón estimula la -

gluconeogénesis.

b) Interacción insulina-glucagón en condiciones lo más -
próximas posibles a las fisiológicas.

El modelo experimental que hemos utilizado ha sido el hígado de rata aislado y perfundido según proceder que detallamos en la Sección de Métodos. Las ventajas de este proceder han sido las del absoluto control del medio y su reproductibilidad.

El abordaje experimental ha consistido en el análisis del tejido y la medida de aquellos metabolitos que intervienen en la secuencia gluconeogénica o que puedan - ejercer algún control sobre alguna de sus etapas. La idea es que el análisis de los cambios en la concentración de - estos metabolitos nos pueda mostrar puntos de interacción sobre los que las hormonas ejerzan su control. Este procedimiento puede ser utilizado en combinación con medida de actividades enzimáticas; no obstante, bajo nuestras condiciones experimentales parece bastante improbable que nin - gún enzima sea limitante. El procedimiento consiste, bási - camente, en la congelación rápida del tejido cuando se ha - lla en situación de equilibrio, seguida de la extracción de sustancias de bajo peso molecular solubles en ácido y su ulterior análisis. Por equilibrio entendemos en este caso que el órgano esté utilizando substratos y produciendo glucosa a velocidades constantes.

El análisis de las variaciones en la concentración

de metabolitos es un abordaje utilizado con gran frecuencia en los últimos años y que ha aportado valiosa información pero que, no obstante, tropieza con una objeción fundamental. Dicha objeción consiste en la compartimentación celular, es decir, la medida de la concentración total de metabolitos no nos informa sobre la proporción en que se encuentran en el compartimento mitocondrial y en el citosólico. La importancia de conocer la concentración de un determinado metabolito, en cada uno de los compartimentos deriva del hecho de que este pudiera ser efector de una reacción que tuviera lugar o sólo en el citosol o sólo en la mitocondria. Es obvio que sólo tendrán importancia en regulación metabólica el estudio de los cambios de concentración del efector en la vecindad de la reacción en cuestión. Ilustraría este punto el citar, por ejemplo, que, en el hígado de rata, la carboxilación de piruvato es una reacción que tiene lugar casi exclusivamente en el compartimento mitocondrial (Scrutton y Utter, 1968; Utter y Scrutton 1969); mientras que la síntesis de fosfoenolpiruvato, es exclusivamente citosólica (Scrutton y Utter, 1968). Este ejemplo nos sirve asimismo para ilustrar la complejidad de la regulación de la síntesis de glucosa. La conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato tiene lugar mediante estas dos reacciones una en cada compartimento celular (ver pag. 19) y el oxalacetato, debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial a su paso, debe salir al citosol como aspartato o malato. Asimismo,

la salida de aniones di ó tricarboxílicos al citosol debe ir acompañada del paso al interior de la mitocondria de otros aniones para así mantener el gradiente electrogénico entre ambos compartimentos.

Resumamos, pues, diciendo que hemos intentado analizar si, bajo las condiciones experimentales descritas, el glucagón y la insulina ejercen su papel regulador alterando la distribución intracelular de metabolitos y, si esto fuera así, analizar el posible papel del transporte mitocondrial de aniones a la luz de los conocimientos actuales sobre este tema.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS

1.- Animales.-

Todos los animales utilizados en nuestros experimentos fueron ratas machos de la raza Wistar cuyo peso medio fué de unos 200 g. Sólo se utilizaron animales cuya variación de peso no fué superior o inferior en un 10% a esta media. Todos los animales fueron adquiridos comercialmente, y hasta su uso, mantenidos en nuestro centro en condiciones controladas de luz y temperatura y con agua y alimento (Pellets CONDOR para rata) ad libitum. Todos los animales fueron ayunados las 24-36 horas previas a su uso experimental.

2.- Reactivos.-

La mayor parte de los reactivos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de Sigma Chemical (St.Louis, Mo. U.S.A.). Los enzimas fueron adquiridos en Boehringer (Mannheim, Alemania).

3.- Técnica de perfusión.-

El medio de perfusión fué un tampón Krebs-Ringer - bicarbonato (Krebs-Henseleit, 1932) con 4% de albúmina bovina. La equilibración con una fase gaseosa conteniendo 5% de dióxido de carbono proporciona un pH final de 7,4.

La albúmina, fracción V de Cohn, fué adquirida comercial - mente. El día antes de su uso era disuelta en un pequeño volúmen de tampón y dializada toda la noche contra varios cambios de Krebs-Ringer Bicarbonato. En algunas experien - cias usamos albúmina preparada según proceder descrito por nosotros. (Jimenez y col., 1974) . Previamente a su uso - el medio de perfusión fué esterilizado mediante filtración a través de membranas de Millipore de $0,45\mu$ de diámetro. La simplicidad de un medio carente de células rojas, faci - lita considerablemente la manipulación de l a preparación, además de permitir el registro continuo de la tensión de oxígeno, técnica que en presencia de hemoglobina se ve - bastante dificultada dada la falta de linealidad entre pO_2 y contenido de este gas. Por otra parte en un estudio com - parativo en el que se utilizaron sistemas libres de hemo - globina, células rojas y fluorocarbon (substancia transpor - tadora de gases) (Goodman, M. y col., 1973) se pudo compro - bar que, con el flujo utilizado en nuestras condiciones ex - perimentales, 28-32 ml/m., las preparaciones con células - rojas no ofrecen ninguna ventaja destacable.

El aparato usado en la perfusión aparece en forma esquemática, en la figura 1. El medio de perfusión, 100 ml. es oxigenado en un cilindro con discos giratorios desde - donde es bombeado hasta el hígado, al que entra mediante otra cánula colocada en la cava inferior y, tras hacerle - pasar por un conducto en el que van convenientemente empla

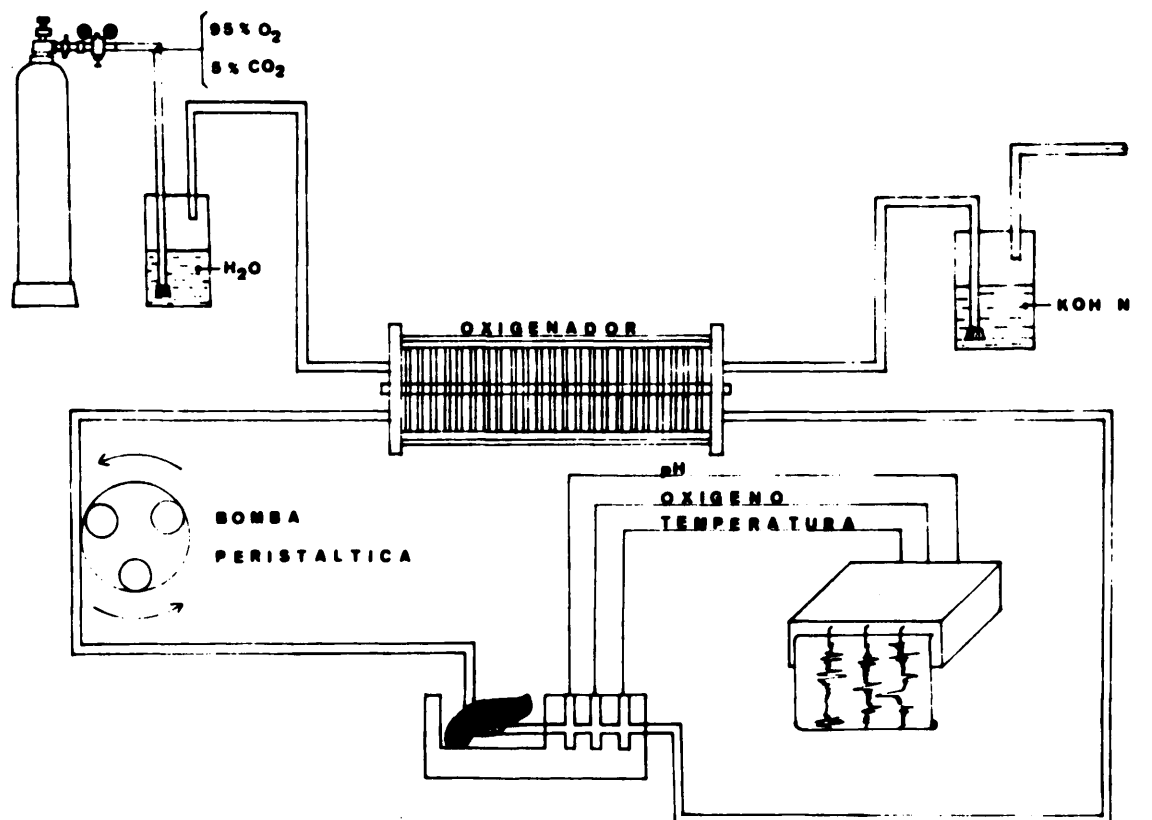


Fig. 1 .- El diagrama muestra en forma muy esquemática el sistema de perfusión utilizado. La temperatura y oxigenación del tampón de perfusión se mantuvieron en los niveles adecuados mediante su recirculación a través de un oxigenador de discos termostatzado. El afluente hepático circula a través de orificios en los que se acoplan los sistemas de medida de oxígeno, pH y temperatura.

zados los sistemas de medida de constantes fisiológicas, vuelve de nuevo al oxigenador, donde volverá a equilibrarse con una fase gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂.

El oxigenador de discos fue accionado mediante un pequeño motor eléctrico que proporcionaba al eje unas 140 rotaciones por minuto. Estos oxigenadores de disco fueron ya utilizados por Scholz (1968) en ratas. En nuestro caso el oxigenador consta de dos cilindros concéntricos y a través del espacio que queda entre ellos se hace circular -- agua a la temperatura adecuada para conseguir que el medio de perfusión tenga 36°C a su entrada al hígado. Otro procedimiento usado por distintos autores para alcanzar la - temperatura deseada consiste en mantener todo el equipo - dentro de armarios termostatzados.

4.- Técnica operatoria.-

La técnica operatoria que hemos empleado presenta la ventaja sobre otras de que el hígado nunca está anóxico durante su preparación. Esta comprende las etapas siguientes:

Tras anestesiar al animal con nembutal sódico (40 mg/Kg), se hace una incisión media abdominal, amplia, y - tras apartar las asas intestinales a la izquierda del animal se preparan ligaduras en vena porta y en cava inferior por encima de la bifurcación de las renales (Fig. 2). A continuación se hace una pequeña incisión en la porta a -

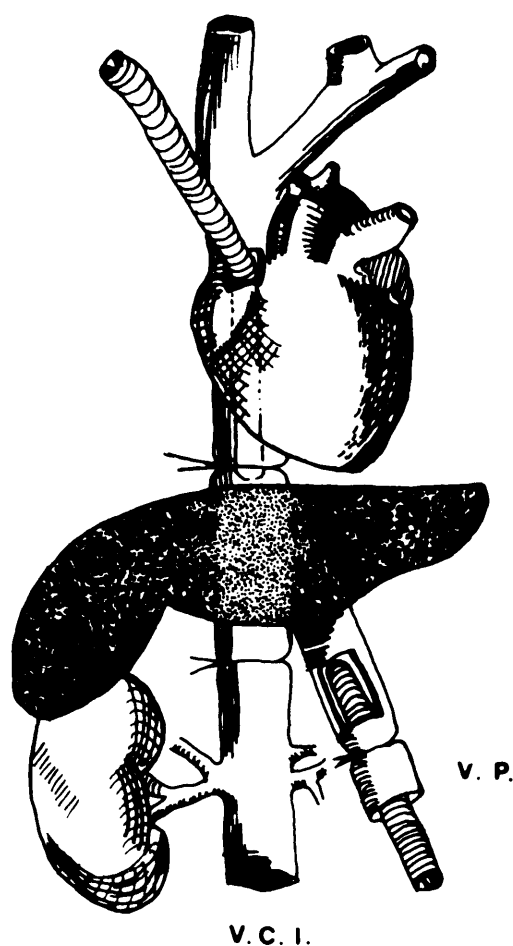


Fig. 2 .- Para la perfusión hepática se inserta una cánula en la vena porta por la que se infunde tampón oxigenado a 36°C e inmediatamente se cortan la aorta y cava inferior - cerca de la bifurcación ilíaca. El lado "venoso" de la perfusión hepática lo constituye otra cánula emplazada en la cava inferior a través de la aurícula derecha.

través de la cual se inserta una cánula por la que fluye (15-20 ml/min.) tampón oxigenado a temperatura adecuada y rápidamente se cortan aorta y cava a la altura de su bifurcación. Este tampón se toma de un reservorio que está conectado a la salida del oxigenador mediante una llave de doble paso. Esta localización permite que al final de la operación, con tan sólo girar la llave, dejemos de tomar tampón del recipiente accesorio y comience a fluir a través del hígado el previamente preparado dentro del oxigenador. Tras consolidar la ligadura de la porta se procede a disecar el intestino. Se debe evitar a toda costa el manosear o herir con instrumental la superficie hepática y si así fuera se desecha la preparación. El paso siguiente - consiste en abrir la cavidad torácica, pasar una (o más) ligaduras por la cava inferior e introducir en ésta una cánula a través de una incisión en la aurícula derecha. Una vez ligada la cánula se procede a apretar la ligadura preparada en la cava inferior por encima de las renales (Fig. 2) con lo que, ahora, todo el líquido que perfundimos aparecerá por la segunda cánula. La última etapa consiste en liberar al hígado de adherencias, aislarlo, y colocarlo en un soporte adecuado aumentando el flujo a 28-32 ml/min. La perfusión del órgano, in situ, sin aislarlo, también es satisfactoria. Es de notar que con esta técnica perfundimos sólo a través de la porta a pesar de lo cual es satisfactorio ya que la arteria hepática no es esencial pa

ra el normal funcionamiento del hígado de rata, (Brauer y col., 1951) y su ligadura no produce alteraciones celulares (Bengmark y col., 1969).

5.- Control Bacteriológico.-

El aparato y todas las partes en contacto con el medio de perfusión al final de cada experimento fueron lavados exhaustivamente y aclarados con agua destilada y desionizada. El medio de perfusión, como se ha dicho anteriormente fué esterilizado antes de su uso. En ningún caso hemos tratado el aparato con antisépticos ni añadido antibióticos al medio de perfusión. Esta decisión fué tomada tras el análisis bacteriológico del medio de perfusión. A los 90 minutos de perfusión, el medio sólo muestra bacterias saprofitas. Su análisis indicó que se trataba de bacterias aerobias, Gram-positivas, no hemolíticas, que podrían ser incluidas dentro de los grupos; Pseudomonas, Flavobacterium y Alcaligenes. En menor cantidad se encontraron cocos Gram-positivos, con capacidad cromogena que podrían ser clasificados en la familia de micrococáceas. El máximo de bacterias que se llegaron a detectar en análisis repetidos fue de 60.000 bacterias/ml a los 90 minutos de perfusión. Esta cifra, unido a su carácter saprofito, nos hicieron pensar que sería más ventajoso eludir la adición de antibióticos al medio.

6.- Comportamiento funcional del hígado aislado y perfundido.-

El exámen microscópico no mostró cambios morfológi cos aparentes y de igual forma el exámen microscópico no - demostró alteraciones patológicas dignas de interés, en aquellas preparaciones cuyo comportamiento funcional había sido adecuado.

La proporción peso húmedo/ peso seco a los 90 minu tos de perfusión dió una cifra de $4,94 \pm 0,06$, (valor me - dio de 87 observaciones). Esta cifra es sensiblemente - igual a los valores hallados en hígados sin perfundir. De igual forma no pudimos detectar aumento significativo en la concentración de K^+ en el medio de perfusión, tras más de 90 minutos de perfusión.

En la figura 3 mostramos el resultado de un experi^u mento tipo en el que, simultáneamente, se midieron la apari^u ción en el medio de actividades láctico-deshidrogenasa (L-Lactate: NAD oxidoreductase E.C. 1.1.1.27) y glutámico-pyrúvico transaminasa (L-Alanine: 2-oxoglutarate aminotrans^u ferase E.C. 2.6.1.2). Como puede verse tras 90 minutos de perfusión la concentración de estas enzimas se halla den^u tro del rango de valores que pueden ser hallados en el plas^u ma, lo que indica que la preservación celular es buena. Las actividades enzimáticas fueron medidas fluorimétrica - mente, utilizando volúmenes de 20-50 μ l de medio de perfu^u

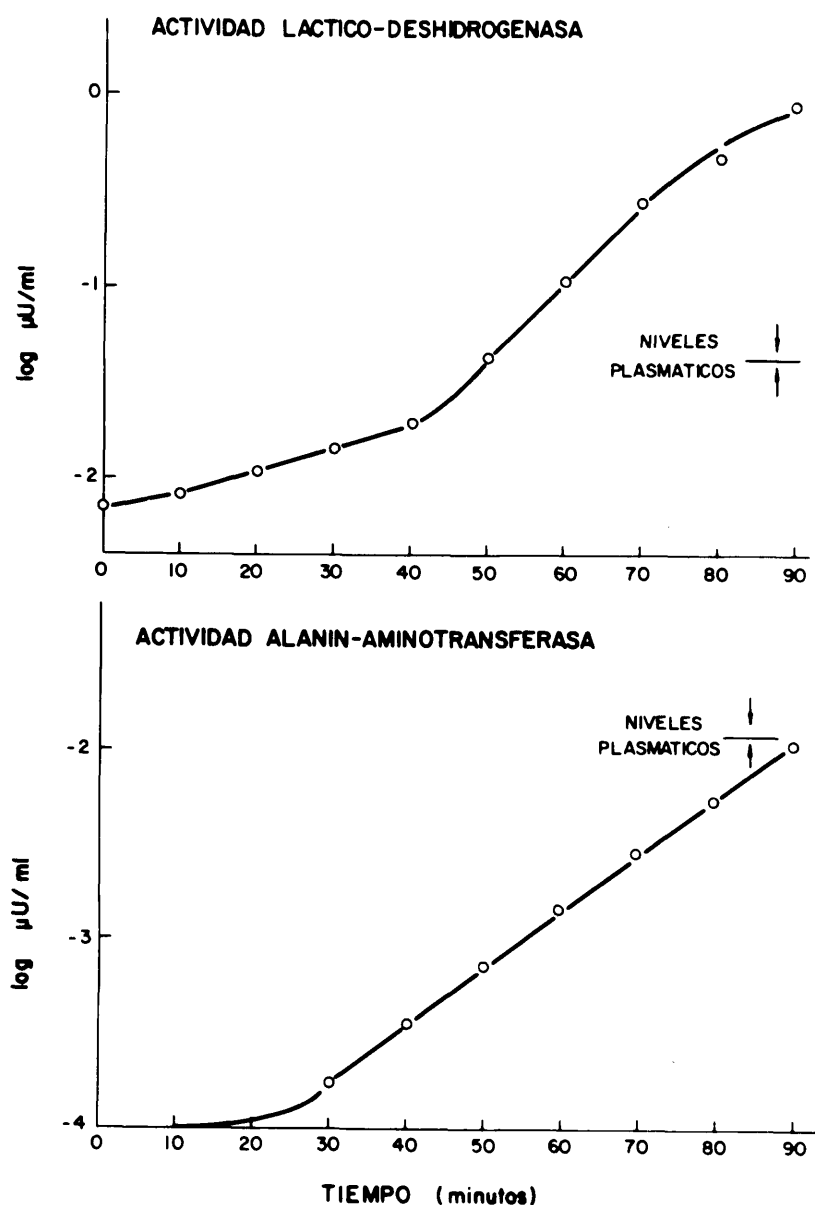
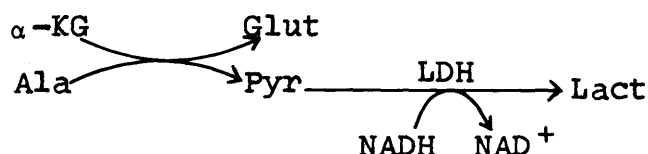


Fig. 3 .- Actividades láctico-deshidrogenasa y alanina-aminotransferasa en el medio de perfusión a lo largo de 90 minutos de experimento. Las flechas indican los niveles de actividad en el plasma del mismo animal inmediatamente antes de aislar el órgano. La liberación de actividad enzimática al medio fue independiente de la adición o no de substratos.

si3n. La mezcla de reacci3n para la medida de l3ctico- des-
hidrogenasa (LDH), en un vol3men final de 2,0 ml de tamp3n
50 mM trietanolamina, 10 mM Cl₂Mg, 5 mM EDTA, pH 7,4 conte-
n3a 10 μ moles de piruvato y 0,2 μ moles de NADH.

La medici3n de glut3mico-pyr3vico transaminasa (GPT)
se efectu3 en un vol3men final de 2,0 ml. de tamp3n 50mM -
trietanolamina, 10 mM Cl₂Mg, y 5 mM EDTA, pH 7,4, conteni en
do 100 μ moles de α -cetoglutarato, 100 μ g de l3ctico-dehi-
drogenasa y 0,2 μ moles de NADH.



La disminuci3n de fluorescencia debida a la oxida -
ci3n de NADH es proporcional a la actividad enzim3tica.

Otros criterios de adecuado funcionalismo han sido
un consumo de ox3geno adecuado a las situaciones funciona -
les y constante a lo largo del tiempo de perfusi3n, as3 co -
mo una adecuado respuesta gluconeog3tica tras la adici3n
de distintos sustratos.

7.- Proceder Experimental.-

Todos los experimentos incluidos en este trabajo -
fueron llevados a cabo de la siguiente forma: Los h3gados
fueron preperfundidos durante 30 minutos en ausencia de -
sustratos al cabo de los cuales se tom3 una muestra y a -

continuación se añadieron substrato y hormonas cuando procediera. La preperfusión hepática garantiza la reproductibilidad de la respuesta al glucagón, quizás debido a que permite la degradación de la insulina que pudiera haber ligada al tejido. Los hígados fueron perfundidos 60 minutos en presencia de substratos y hormonas durante los cuales se tomaron muestras del medio (1 ml) cada 10 minutos. Los cambios de volúmen fueron tenidos en cuenta para hacer los cálculos.

El L-láctico fué añadido al medio como sal sódica para evitar cambios de pH. Preparamos un stock de 1 M L - lactato sódico que almacenamos congelado a -20°C y usamos a lo largo de todos los experimentos. La adición de 1 ml al medio de perfusión nos proporcionaba una concentración final de 10 mM. Con la L-alanina procedimos de igual manera.

En algunos experimentos mantuvimos constante la concentración del substrato mediante su infusión continua.

La insulina, obsequio de Lilly Indiana, fué disuelta (1mg/ml) en agua bidestilada pH 3.0 y congelada en pequeñas aliquotas que antes de su uso eran diluidas en forma apropiada con Krebs-Ringer conteniendo 11% de albúmina bovina. La concentración final de insulina en el medio de perfusión fué de $10,5 \times 10^{-9}$ M. El glucagón, también obsequio de Lilly Indiana, fué diluido y almacenado en 0,1 M Glicina pH 10. Las diluciones precisas también se hicieu

ron en tampón con albúmina y su concentración final en el medio fué de $2,1 \times 10^{-9}$ M.

8.- Métodos analíticos.-

a) Medio de perfusión.- Cada 10 minutos fué tomado 1 ml de medio de perfusión y rápidamente deproteinizado añadiéndolo a un tubo de ensayo conteniendo 2 ml de ácido perclórico al 6% a $0-4^{\circ}\text{C}$. Tras centrifugar, el sobrenadante fué llevado a pH 6 con CO_3K_2 0,5 M. En los experimentos iniciales se añadió 0,5 M trietanolamina al CO_3K_2 para facilitar el ajuste de pH; no obstante se vió que este tampón interfería notablemente con el sistema de oxidoreducción para la medida de la glucosa. Los volúmenes usados para neutralizar fueron registrados y se halló un factor de dilución (F.D.P.).

b). Tratamiento del tejido.- Al final de cada experimento, los hígados fueron congelados in situ con pinzas de aluminio (Wollemberger y col., 1960), diseñadas y construidas en el Servicio de Instrumentación del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), enfriadas en nitrógeno líquido o con una mezcla de nieve carbónica y metanol. Los hígados congelados fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta la fecha de su procesamiento.

Para su análisis el tejido fué desecado por liofilización. Previamente fueron determinadas las condiciones óptimas de vacío y temperatura del condensador para prevenir la descongelación de las muestras. El tiempo de liofiliza -

ción fué de 12-18 horas.

c) Extracción de metabolitos.- Aproximadamente unos 200 mg de peso seco fueron tratados con 7 ml de ácido perclórico. En una primera etapa se introdujo el tejido en el homogenizador, enfiado en un recipiente con nitrógeno líquido, donde fué pulverizado con una espátula y a continuación homogenizado con 4 ml de ácido perclórico al 6% en etanol al 40% (este último para bajar el punto de congelación). El homogenado fué centrifugado y el pellet tratado en otros 3 ml de ácido perclórico al 6%, con los que previamente se habían lavado los residuos del homogenizador. Uniendo los sobrenadantes, se registró el volúmen recogido, para tenerlo luego en cuenta al hacer los cálculos, y es llevado a pH 6,0 con CO_3K_2 3 M conteniendo trietanolamina 0,5 M. Al final calculamos el factor de dilución de la siguiente manera:

$$\text{F.D.} = \frac{\text{Volumen de extracción(ml)} \times \text{Volumen final (ml)}}{\text{Volumen antes de neutralización (ml)} \times \text{Peso seco del tejido (g)}}$$

Este factor multiplicado por la concentración de metabolito en nmoles/ml de medio de extracción nos da directamente su concentración en nmoles/g de peso seco de tejido.

d) Medición de metabolitos.- Casi todos los metabolitos fueron medidos mediante raciones que, de una u otra forma, acaban produciendo cambios en el estado de reducción de nucleótido de nicotinamida. Estas técnicas se

apoyan en el hecho de que la forma reducida de este nucleótido absorbe luz a 340 nm y emite fluorescencia a 465 nm cuando es excitada con luz de 340 nm de longitud de onda. Utilizamos un fluorómetro diseñado y construido en la Universidad de Pensylvania (Mayer y col., 1969).

Oxalacetato, triosa fosfato y fructosa difosfato fueron medidas en la misma cubeta, usando trietanolamina 50 mM Cl_2Mg 10 mM y EDTA 5 mM , pH 7,4 y añadiendo en sucesión malato deshidrogenasa (L-Malate: NAD oxidoreductase 1.1.1.37), α -glicerofosfato deshidrogenasa (L-glycerol-3-phosphate: NAD oxidoreductase 1.1.1.8) y aldolasa (Fructose-1,6-Diphosphate D-glyceroaldehyde-3-phosphate-liase 4.1.2.13). Piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglycerato, 3-fosfoglycerato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato y nucleótidos de adenina, han sido medidos mediante adaptaciones fluorométricas de otros métodos (Bergmeyer, 1965).

β -hidroxibutirato y acetoacetato (Williamson y col. 1962), intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, CoA y derivados acyl-CoA fueron también medidos fluorométricamente (Williamson y Corkey, 1968).

Glutamato (Bernt y Bergmeyer, 1963), aspartato - (Pfleiderer, 1963) lactato (Hohorst, 1963) y alanina fueron medidos espectrofotométricamente. La alanina fué medida con alanina deshidrogenasa (L-Alanine: NAD oxidoreductase (deaminating) 1.4.1.1.) con tampón 0,5 M Tris-hidroxirina, 5 mM EDTA, 1 mM Mercaptoetanol pH 9,5 conteniendo 200 μ moles de NAD^+ .

Urea (Fearon, 1939; Beale y Craft, 1961) y glucosa (Hoffman, 1937) fueron medidos colorimétricamente.

La glucosa fué medida según el método de ferricianuro de Hoffman mediante un sistema de flujo continuo para el que usamos los componentes mecánicos Technicon y un registrador potenciométrico Leeds and Northrup. El colorímetro utilizado, debido a que lee transmisión, da una respuesta logarítmica, por lo que para facilitar y aumentar la precisión de los cálculos, hicimos las operaciones siguientes:

- 1) Hallar logaritmos de las lecturas.
- 2) Representar los valores del patrón y hallar la pendiente y ordenada en el origen.

El cálculo de la concentración de glucosa en las muestras se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Glucosa (x)} = \frac{\log T (x) - \text{ordenada en origen}}{\text{pendiente del patrón}}$$

Obviamente, las unidades de concentración dependerán de las del patrón. Si el patrón, por conveniencia, estuviera expresado en mg entonces la concentración mM de glucosa la hallamos de la siguiente forma:

$$\text{Glucosa (mM)} = \frac{\log T - \text{ordenada en origen}}{\text{pendiente}} \times \frac{1000}{180} \times \text{F.D.}$$

donde 180 es el peso molecular de la glucosa y F.D. el factor de dilución de la muestra. Este procedimiento permite la medida de gran número de muestras de una vez, lo que

proporciona mayor exactitud.

e) Medida del consumo de oxígeno.- El consumo de oxígeno fué calculado conociendo la diferencia de concentración arterio-venosa. La medición se efectuó polarográficamente con un electrodo de platino, Y.S.5331, de la casa Yelow Spring Instruments (Ohio, U.S.A.) y un amplificador diseñado y construido en la Universidad de Pensylvania (U.S.A.). La concentración arterial fué calculada midiendo la tensión de oxígeno en el medio de perfusión, recirculando, antes de colocar el hígado. Los cálculos de concentración de oxígeno, se hicieron refiriendo los valores obtenidos a una calibración previa, hecha con gases de concentración de oxígeno conocida (95% O₂, 50% O₂, aire (21% O₂) y nitrógeno).

El consumo de oxígeno por el hígado, expresado en μ átomos/100 g. Peso corporal/hora, lo calculamos de la siguiente manera:

$$\text{Consumo O}_2 \text{ (} \mu \text{átomos/100 g P.C./Hr)} = \frac{[A-V] \text{ (mM)} \times \text{Flujo (ml/min)} \times 60 \times 2}{\text{Peso corporal} \times 100}$$

9.- Cálculo y expresión de los resultados.-

La concentración de metabolitos ha sido expresada como nmoles x g peso seco⁻¹. Estos datos pueden ser extrapolados a peso húmedo conociendo que en nuestra situación la proporción húmedo/seco fué de 4,94.

Habida cuenta que los hígados fueron congelados al

final de cada experimento, por conveniencia, los datos relativos a la utilización de substratos y producción de glucosa u otros metabolitos, han sido expresados como:

$\mu\text{moles}/100 \text{ g Peso Corporal}/\text{Hr}$

eventualmente estos datos podrían ser transformados en:

$\mu\text{moles}/\text{g de hígado}$

teniendo en cuenta que la relación peso hígado/peso, corporal, en 16 ratas de alrededor de 200 g resultó ser:

$\text{g hígado}/100 \text{ g Peso corporal} = 3.77 \pm 0.12$

Esta relación cambia con el ayuno (Parrilla y Toews, 1974) convirtiéndose en:

$\text{g hígado}/100 \text{ g Peso corporal} = 3.32$

Los cambios metabólicos fueron calculados en intervalos en que tuviéramos mayor certeza de que la preparación, metabólicamente, se hallaba en equilibrio; de ahí que eligiéramos los últimos 30 minutos de perfusión en cada grupo de experimentos.

La evaluación estadística de los datos fué hecha utilizando una calculadora de mesa, programable, Olivetti P-102.

R E S U L T A D O S
=====

RESULTADOS

1.- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre el metabolismo hepático de L-Lactato sódico.-

a) Cambios en el medio de perfusión.-

La fig. 4 muestra la producción hepática de glucosa durante sesenta minutos de perfusión. La gráfica ha sido confeccionada omitiendo, para mayor claridad, la glucosa producida en los primeros treinta minutos de perfusión en ausencia de lactato. Puede apreciarse que la presencia de glucagón, estimuló claramente la producción de glucosa, mientras que la adición de insulina revirtió el efecto estimulante del glucagón. En la fig. 5 podemos apreciar que el efecto estimulante del glucagón no es resultado de una glucogenolisis aumentada, ya que el glucagón produjo un aumento en la utilización de lactato paralelo al efecto estimulante de la producción de glucosa. De igual forma, la insulina revirtió el efecto estimulante del glucagón sobre la utilización de lactato.

La producción de pyruvato (Fig.6) aumentó durante los primeros veinte minutos de perfusión. A partir de este momento, la concentración de pyruvato en el medio descende gradualmente, indicando que el hígado, de productor, pasa a ser consumidor de este metabolito. Estos cambios son, como veremos más tarde, un reflejo del estado de oxi-

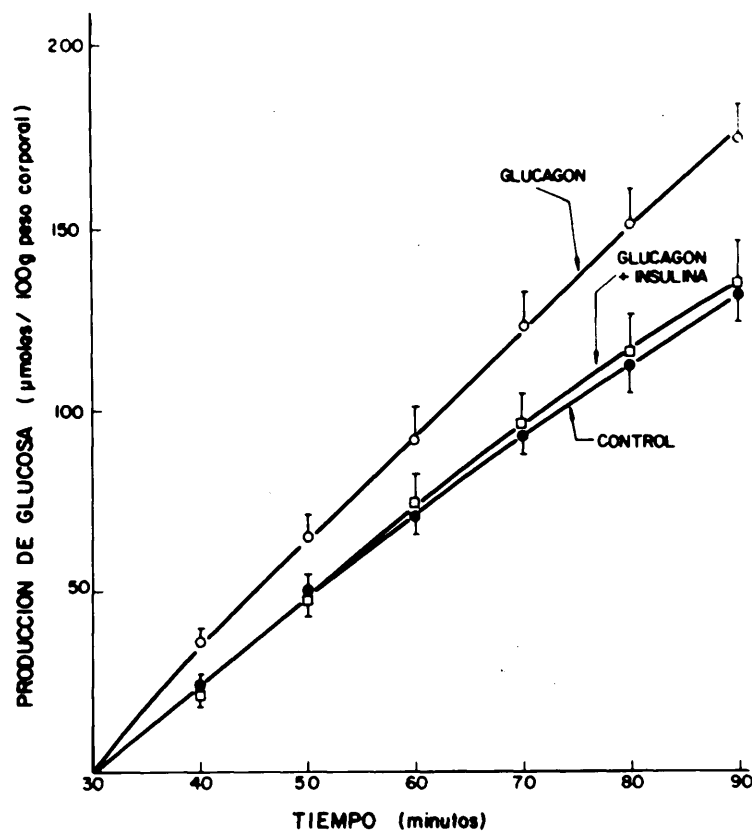


Fig. 4 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina so bre la producción de glucosa a partir de L-Lactato sódico (10 mM). Las adiciones de hormonas y/o sustrato fueron he_{ch}as a los 30 minutos de perfusión. Los puntos representan valores medios de ocho perfusiones y las barras verticales el error tipo de la media.

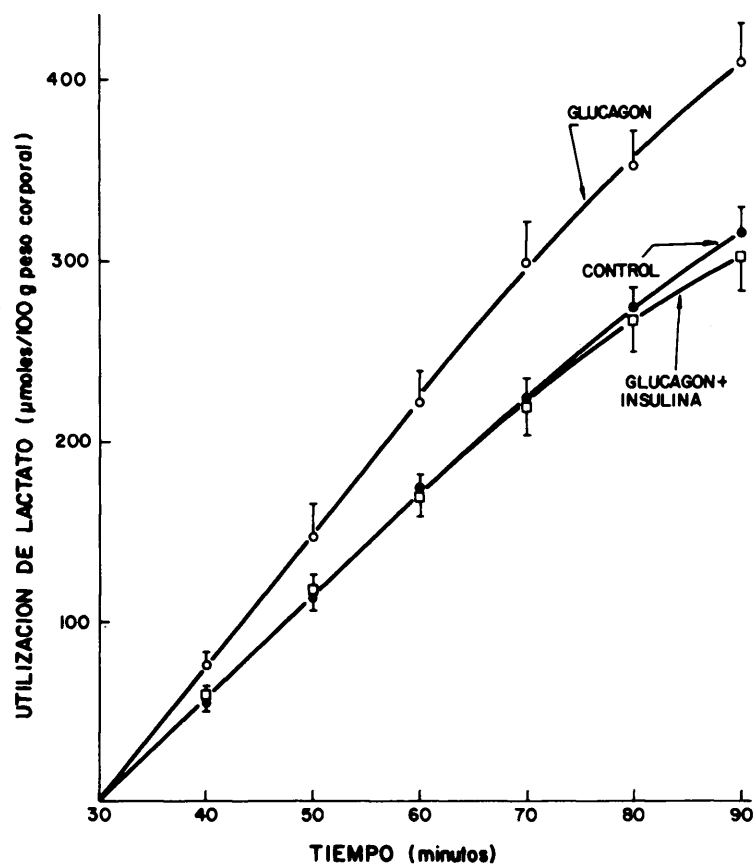


Fig. 5 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina so bre utilización hepática de L-Lactato sódico. Los puntos representan valores medios de al menos ocho perfusiones y las barras verticales el error tipo de la media.

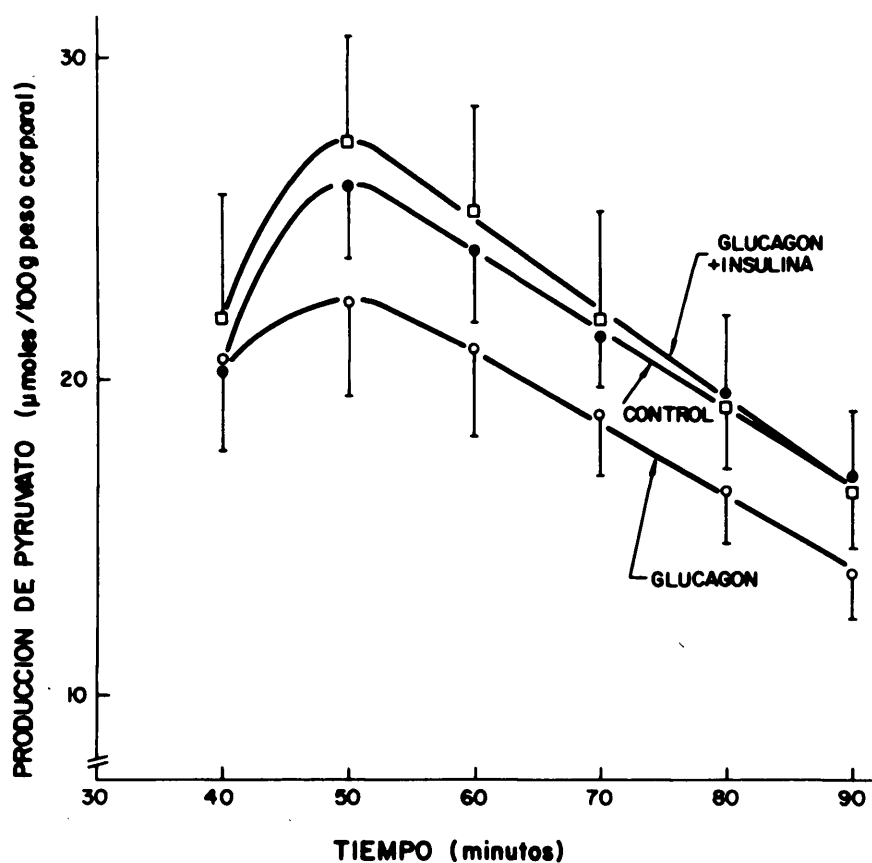


Fig. 6 .- Producción de piruvato a partir de L-lactato sódico. Efecto de glucagón y de glucagón más insulina. Los puntos representan valores medios y las barras verticales el error tipo de la media.

de reducción de los nucleótidos de piridina del citosol. La disminución gradual de piruvato es consecuencia de la disminución paralela de lactato y tiene como fin el mantener la constancia del cociente $[NAD^+]/[NADH]$.

El glucagón estimuló la producción total de urea en un 40% (Fig. 7), efecto que la insulina no consiguió - revertir totalmente, como lo hizo con la producción de glucosa. Este aumento de la ureogénesis en ausencia de substratos nitrogenados en el medio, sugiere que la hormona ha debido actuar movilizando aminoácidos ya que el pool de aminoácidos libres del tejido no podría dar cuenta de este aumento en la producción de urea; por otra parte los aminoácidos que hemos medido no mostraron variaciones de importancia en su concentración (Tablas 12 y 14), lo que indica que el incremento en la producción de urea sea el resultado de una proteólisis incrementada. La proteína degradada puede ser o bien la albúmina bovina que añadimos al medio o bien proteína tisular.

En las tablas 1 y 2 ofrecemos una síntesis de los efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre el metabolismo de lactato. Los cálculos han sido hechos por diferencia entre los valores hallados a los 60 y 90 min. de perfusión; es decir, el último período de 30 min. en presencia de substrato y de hormona. Esto se ha hecho así porque durante este período existen mayores garantías de que la preparación haya alcanzado una situación de equilibrio.

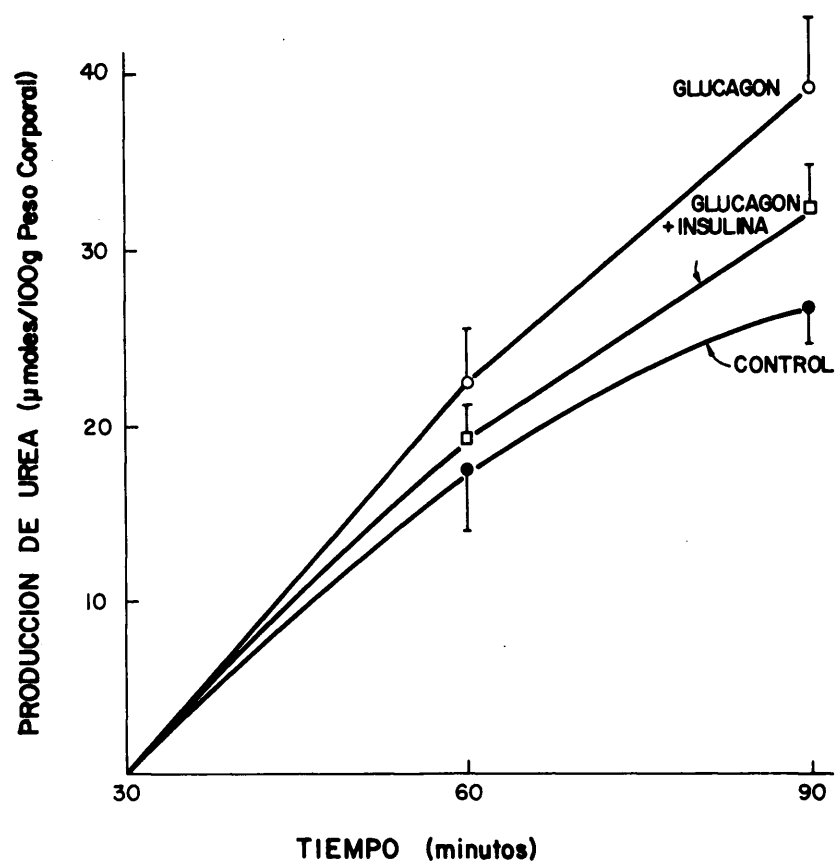


Fig. 7 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la producción de urea en hígados perfundidos con L-lactato sódico (10mM). Los puntos son valores medios y las barras verticales representan el error tipo de la media.

Tabla 1.- Efecto de glucagón más insulina sobre gluconeogénesis a partir de L-lactato sódico. Hígados de ratas machos, de 200 g. de peso, ayunadas 24-36 horas, fueron utilizados en todos los experimentos. Los hígados fueron perfundidos 30 minutos antes de la adición de lactato hasta alcanzar concentraciones de 8-12 mM. Los flujos metabólicos fueron calculados por diferencias en el intervalo 60-90 minutos de perfusión. Las cifras representan valores - medios de al menos ocho perfusiones \pm error tipo.

Adiciones	Producción de glucosa (μ moles/100 g.P.C./Hr.)	% de variación	Lactato/glucosa
Ninguna	123 \pm 10	100	2.30 \pm 0.20
Glucagón	165 \pm 8	134	2.26 \pm 0.05
Glucagón + Insulina	120 \pm 10	98	2.30 \pm 0.19

Tabla 2 .- Efecto de glucagón y de insulina sobre el metabolismo de lactato y producción de urea. Los flujos metabólicos fueron calculados hallando las diferencias en el intervalo 60-90 minutos de perfusión. Las cifras representan valores medios de al menos ocho perfusiones \pm error tipo.

Adiciones	Utilización de lactato	Conversión de lactato a glucosa	Producción de piruvato	Lactato oxidable *	Producción de urea
$\mu\text{moles}/100 \text{ g. peso corporal/hora}$					
Ninguna	287 \pm 16	246 \pm 20	14.6 \pm 2.0	26.4	24 \pm 3.9
Glucagón	375 \pm 24	330 \pm 16	15.5 \pm 2.5	29.5	34 \pm 2.6
Glucagón + Insulina	264 \pm 20	240 \pm 20	7.3 \pm 1.0	16.7	29 \pm 1.7

* Calculado por diferencia.

La tabla 1 nos muestra que el glucagón estimuló un 34% la producción de glucosa comparado con el control en ausencia de hormonas. La proporción, lactato utilizado: Glucosa producida, resultó ser de 2,3 y la presencia de hormonas no alteró este cociente. Puesto que la síntesis de una molécula de glucosa requiere dos de lactato, esto quiere decir que es muy escasa la cantidad de lactato disponible para otros procesos que no sean gluconeogénesis. La importancia de este punto viene dada por el interés en conocer la fuente de la que la célula obtiene el ATP necesario para la síntesis de glucosa. En la tabla 2 se establece un balance metabólico en el, que, por diferencias, podemos llegar a estimar la cantidad de sustrato oxidable en cada situación experimental. La oxidación completa de 26 moléculas de lactato, daría lugar a 312 moléculas de ATP, mientras que en los mismos hígados se han debido utilizar 738 enlaces fosfatos de alta energía para la síntesis de 123 moléculas de glucosa. El balance -- energético es, pues, negativo, aún habiendo menospreciado en esta estimación la síntesis de cuerpos cetónicos y el NADH (^{producido}~~consumido~~) para la conversión de lactato a piruvato en el citosol.

b) Intermediarios de gluconeogénesis.--

En la tabla 3 se muestran los cambios en la concentración de intermediarios de la gluconeogénesis bajo las distintas situaciones experimentales estudiadas. Para

Tabla 3 .- Concentración hepática de intermediarios de la secuencia gluconeogénica. Los hígados, tras ser perfundidos durante 60 minutos con lactato sódico (10 mM), fueron rápidamente congelados con bloques de aluminio enfriados en nitrógeno líquido y procesados ulteriormente según se describe en Métodos. En todos los casos los hígados - fueron perfundidos durante 30 minutos antes de la adición de lactato sódico y hormonas.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g Peso seco		
[Lactato]	14595 \pm 910	13834 \pm 948	13721 \pm 948
[Pyruvato]	995 \pm 119	808 \pm 76	944 \pm 101
[Oxaloacetato]	19 \pm 2	11 \pm 1	16 \pm 3
[Malato]	1186 \pm 161	1334 \pm 101	1249 \pm 112
[P-enol-Pyruvato]	466 \pm 66	638 \pm 42	492 \pm 62
[3-P-Glycerato]	351 \pm 62	517 \pm 77	360 \pm 60
[Triosa-P]	36 \pm 4	41 \pm 4	39 \pm 6
[α -Glycerofosfato]	1034 \pm 68	1152 \pm 102	933 \pm 66
[Fuctosa-di-P]	49 \pm 5	46 \pm 2	48 \pm 4
[Fructosa-6-P]	28 \pm 3	41 \pm 5	30 \pm 5
[Glucosa-1-P]	16 \pm 2	21 \pm 2	15 \pm 2
[Glucosa-6-P]	180 \pm 15	232 \pm 16	203 \pm 18

su más cómodo análisis hemos representado estos valores en la fig. 8 como variaciones respecto al control y en la misma secuencia que estos aparecen en la síntesis de glucosa. Este tipo de representación es característico del análisis de un sistema mediante el llamado teorema de "cross-over" o punto de intersección. Originalmente ideado por Chance y col., (1955 y 1956) este teorema tuvo su aplicación para el estudio del control del transporte de electrones en la cadena respiratoria, aunque posteriormente fue utilizado - indiscriminadamente para el análisis de multitud de sistemas. En términos prácticos resumiremos diciendo que en los puntos sobre los que el control es ejercido, cabría esperar una disminución en el control de intermediarios en el lado del sustrato y un acúmulo en el lado del producto. Esto daría lugar a una intersección o "cross-over" cuando los valores se expresan gráficamente contra el control. Como hemos dicho Chance y col. utilizaron este tipo de análisis sólo para el estudio de problemas concretos de la cadena respiratoria aunque más tarde dieron una definición más simple y general (Chance y col., 1958) para describir transiciones de un estado de equilibrio a otro. La principal objeción con la que tropieza la utilización de este teorema para su uso general en regulación metabólica es la de que se parte de la base de que hay una conservación de los intermediarios que participan en la ruta metabólica. Si bien esto es cierto para el caso de la cadena respiratoria, dista mucho de ser así para la mayoría de los siste -

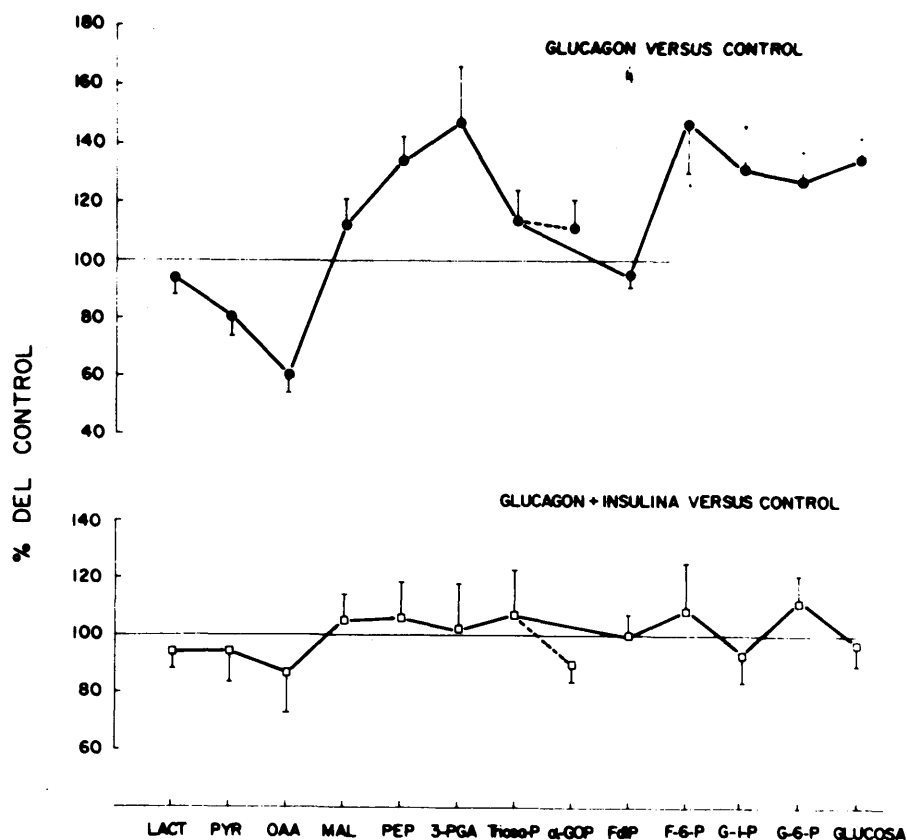


Fig. 8 .- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración de intermediarios de la secuencia gluconeogénica en hígados perfundidos con L-Lactato sódico -- (10 mM). Los valores, media de ocho experimentos \pm error tipo, son expresados como porcentaje de variación respecto al control (abscisa). La línea entrecortada señala aquellos intermediarios que no forman parte directa de la secuencia. Los hígados fueron congelados a los 60 min. de la adición de subtrato y procesados según se describe en la sección de Métodos.

mas. Un detallado análisis de este teorema ha sido ofrecido por Holmes (1959) y más recientemente por Rolleston -- (1966).

En nuestro caso hemos representado de esta forma - las variaciones en la concentración de intermediarios por conveniencia, ya que creemos que es una forma cómoda de - mostrar cambios cualitativos; pero no pretendemos analizar estos cambios sobre la base de teorema del "cross-over".

La fig. 8 muestra que la adición de glucagón produce, junto con el estímulo en la producción de glucosa, un nuevo equilibrio en la concentración de intermediarios de la vía. Esta nueva situación de equilibrio se caracteriza por: Disminución de la concentración de metabolitos por detrás de oxalacetato y su aumento por delante hasta triosa-fosfato. Estos cambios se reflejan gráficamente (fig.8) como un primer punto de intersección que probablemente refleja un aumento de actividad en la encrucijada oxalacetato-fosfoenolpiruvato. Un segundo punto de intersección aparece como consecuencia de una disminución en la concentración de fructosa difosfato y aumento de hexosa fosfato. Este cambio puede ser un reflejo de un aumento de actividad de fructosa difosfatasa o inhibición de fosfofructokinasa. Sabemos que fosfofructokinasa es activada por AMP y ADP e inhibida por ATP y citrato (Lowry y Passonneau, 1966) mientras que fructosa difosfato fosfatasa es inhibida por AMP (Taketa y Pogell, 1965). Del análisis de los cambios en

la concentración de citrato (tabla 4) y de nucleótidos de adenina (tabla 5) resulta que el único cambio compatible con nuestros hallazgos sería el acuso aumento en la concentración de citrato.

La adición de insulina conjuntamente con el glucagón resultó en una reversión del patrón de intermediarios que acabamos de describir (Fig. 8). Esto, si no prueba, al menos, sugiere que existe una correlación entre el aumento de gluconeogénesis y el patrón de intermediarios descrito. En otras palabras, los cambios descritos deben tener alguna relación con el aumento de flujo en la vía.

c) Intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Los cambios en la concentración de estos intermediarios aparecen descritos en la tabla 4 y representados en forma "cross-over" en la Fig. 9. El glucagón aumentó la concentración de citrato, isocitrato, α -ketoglutarato y malato y disminuyó la de oxalacetato, acetyl-CoA y aspartato. Estos cambios sugieren o bien un aumento de actividad de citrato sintetasa (citrate oxalacetate-lyase (CoA-acetylating) 4.1.3.7) o bien una inhibición de α -KEToglutarato oxidasa o quizás succinato deshidrogenasa (succinato (aceptor) oxidoreductase 1.3.99.1.).

La acción de la insulina aquí también revirtió los cambios inducidos por el glucagón (Fig. 9).

d) Nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno.

La acción del glucagón se caracterizó (Tabla 5) -

Tabla 4 .- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración hepática de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en presencia de L-lactato sódico (10 mM) como sustrato. Las cifras representan valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[Malato]	1186 \pm 161	1334 \pm 101	1249 \pm 112
[Oxalacetato]	19 \pm 2	11 \pm 1	16 \pm 3
[Acetyl-CoA]	347 \pm 30	268 \pm 35	335 \pm 60
[Citrato]	218 \pm 266	2518 \pm 376	2202 \pm 244
[Isocitrato]	91 \pm 6	132 \pm 8	83 \pm 8
[α -Ketoglutarato]	1763 \pm 125	2009 \pm 242	1766 \pm 168
[Glutamato]	9481 \pm 372	10297 \pm 470	8981 \pm 1107
[Aspartato]	1902 \pm 155	1515 \pm 84	1766 \pm 179

Tabla 5 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre el contenido en nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno de hígados perfundidos con L-Lactato sódico (10 mM). Las cifras representan valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[ATP]	7740 \pm 628	7422 \pm 390	8287 \pm 562
[ADP]	2333 \pm 153	2899 \pm 218	2622 \pm 110
[AMP]	1595 \pm 72	1790 \pm 82	1804 \pm 156
[ATP] / [ADP]	3.36 \pm 0.29	2.64 \pm 0.21	3.16 \pm 0.26
$\frac{[ATP]}{[ADP]^2} / [AMP]$	2.10 \pm 0.15	1.87 \pm 0.24	2.01 \pm 0.18
Consumo de O ₂ * (μ átomos/100 g P.C./Hr.)	276	339	300

* Trasustracción de la respiración en ausencia de sustrato.

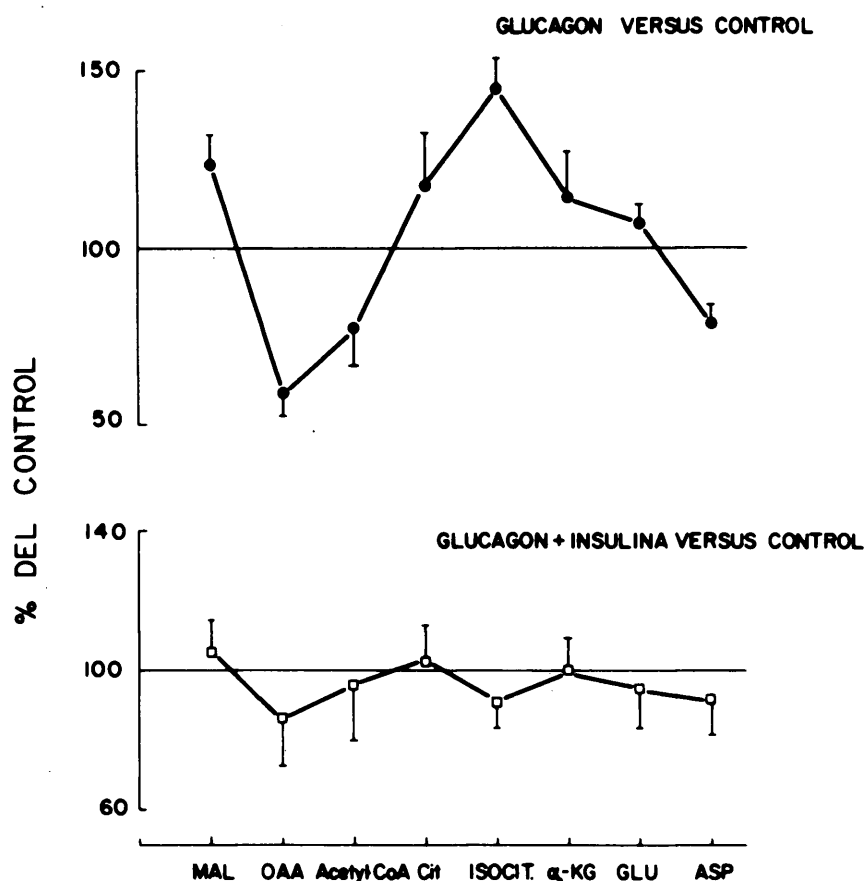


Fig. 9 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en hígados perfundidos con L-Lactato sódico (10 mM). Los valores, media de ocho observaciones \pm error tipo, aparecen representados como porcentaje del control. Los hígados fueron congelados a los 60 min. de la adición de sustrato y procesados según se describe en la Sección de Métodos.

por una disminución del cociente $[ATP] / [ADP]$ y un ligero aumento en la concentración de AMP. La constancia de la expresión $[ATP] [AMP] / [ADP]^2$, cociente de acción de masas de adenylato-kinasa (ATP:AMP phosphotransferase 2.7.4.3.), y la proximidad de los valores hallados al de 2.26 descrito para la constante de equilibrio (Eggleston y Hems, 1952), indican que esta acción se halla próxima a su equilibrio termodinámico.

El glucagón aumentó el consumo de oxígeno en unos 65 μ átomos/100 g P.C./Hr. Asumiendo un cociente P:O de 3, los enlaces ricos en fosfato generados con ese incremento en el consumo de oxígeno, son ligeramente inferiores a los requeridos para dar cuenta del estímulo gluconeogénético. Esto quizás implique que el glucagón obtenga esa energía extra mediante una redistribución del consumo de la energía útil de que dispone la célula.

2.- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre el metabolismo hepático de L-Alanina.-

En la introducción de este trabajo (pag. 6) ya hicimos alusión a la importancia fisiológica de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos poniendo de manifiesto la correlación observada entre movilización de aminoácidos y gluconeogénesis. Los aminoácidos son la fuente de la que el organismo se vale para la neoformación de glucosa. La fig. 10 es una prueba experimental de lo dicho. En esta -

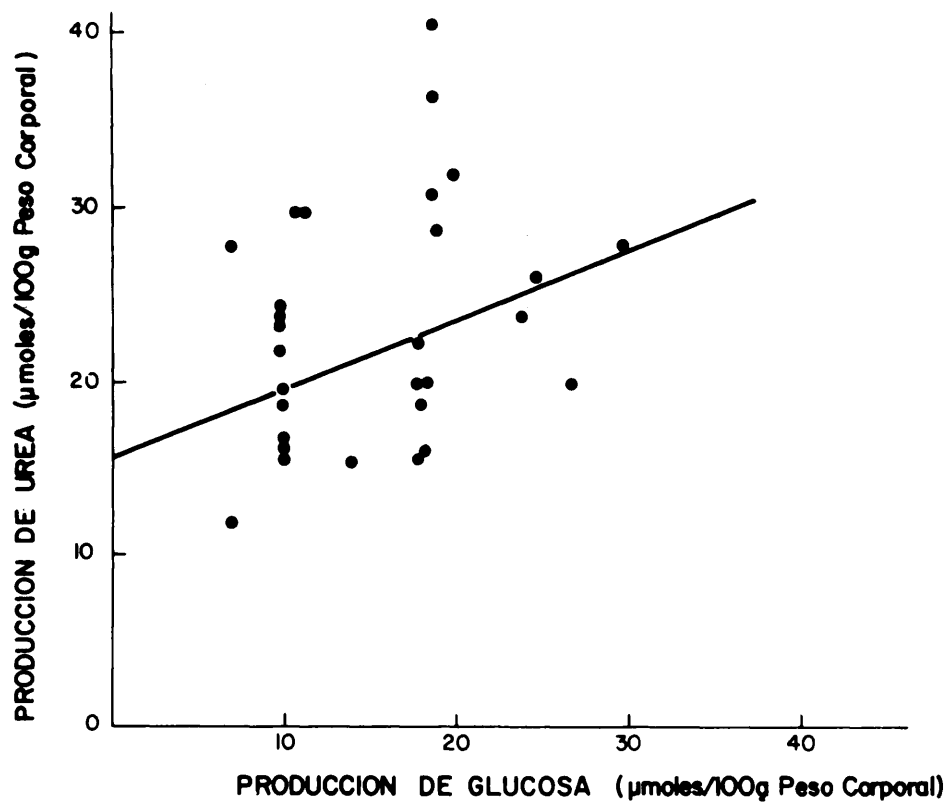


Fig. 10 .- Correlación entre producciones de glucosa y de urea en hígados perfundidos en ausencia de fuentes exógenas de carbono y nitrógeno. Glucosa y urea fueron medidos a los 30 min. de perfusión.

figura se correlacionan las producciones de glucosa y urea en hígados perfundidos en ausencia de fuente exógena de carbono. En estas circunstancias existe una clara correlación entre ambos procesos ($y = 16.08 + 0.38 x$).

Para nuestros experimentos hemos elegido el aminoácido alanina porque fisiológicamente es el que es liberado por el músculo (London, 1965) y utilizado por el hígado (Owen y col., 1969) en proporciones más importantes. La importancia de la alanina como precursor gluconeogénico también ha sido puesta de manifiesto en experimentos *in vivo* bajo circunstancia de aumento en las demandas gluconeogénicas (Parrilla y Toews, 1974a).

a) Cambios en el medio de perfusión.-

La figura 11 muestra el efecto de glucagón más insulina sobre la producción de glucosa. El glucagón produjo un claro efecto estimulante desde el comienzo de la perfusión. La acción conjunta de glucagón e insulina dio lugar a una inhibición del efecto del glucagón pero sin llegar a los niveles del control.

La producción de lactato (Fig. 12) fué prácticamente lineal durante los veinte primeros minutos de perfusión a partir de los cuales decayó bruscamente. No hubo diferencias apreciables entre el control y los hígados perfundidos en presencia de hormonas.

La producción de pyruvato, sí parece estar influenciada por la presencia de hormonas (Fig. 13). La produc -

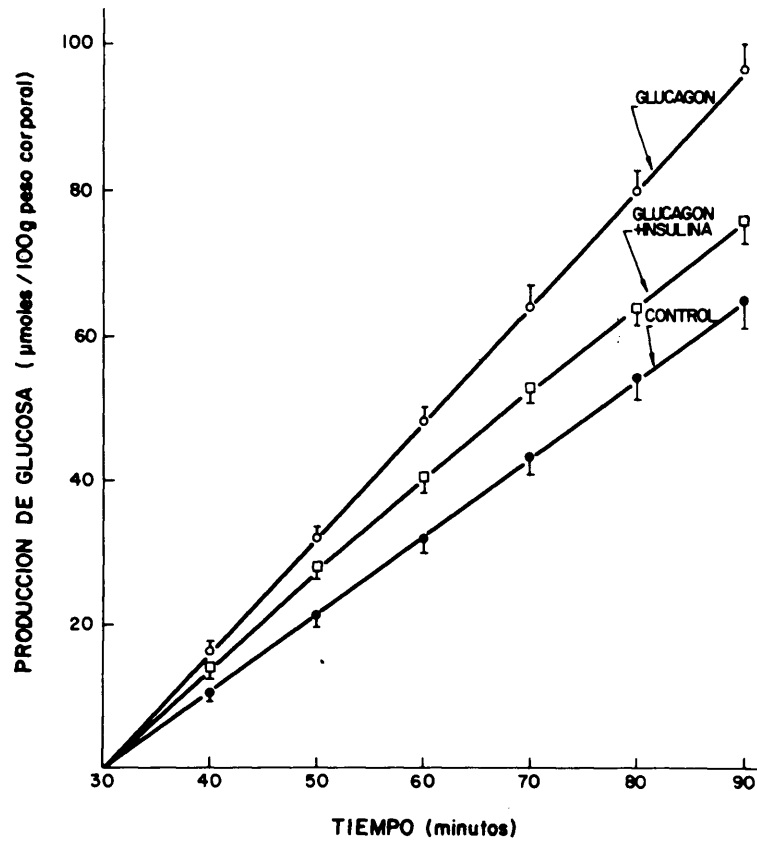


Fig. 11 .- Producción de glucosa a partir de L-alanina (10 mM). Efecto de glucagón más insulina. Los puntos representan los valores medios de al menos ocho experimentos y las barras verticales el error tipo de la media.

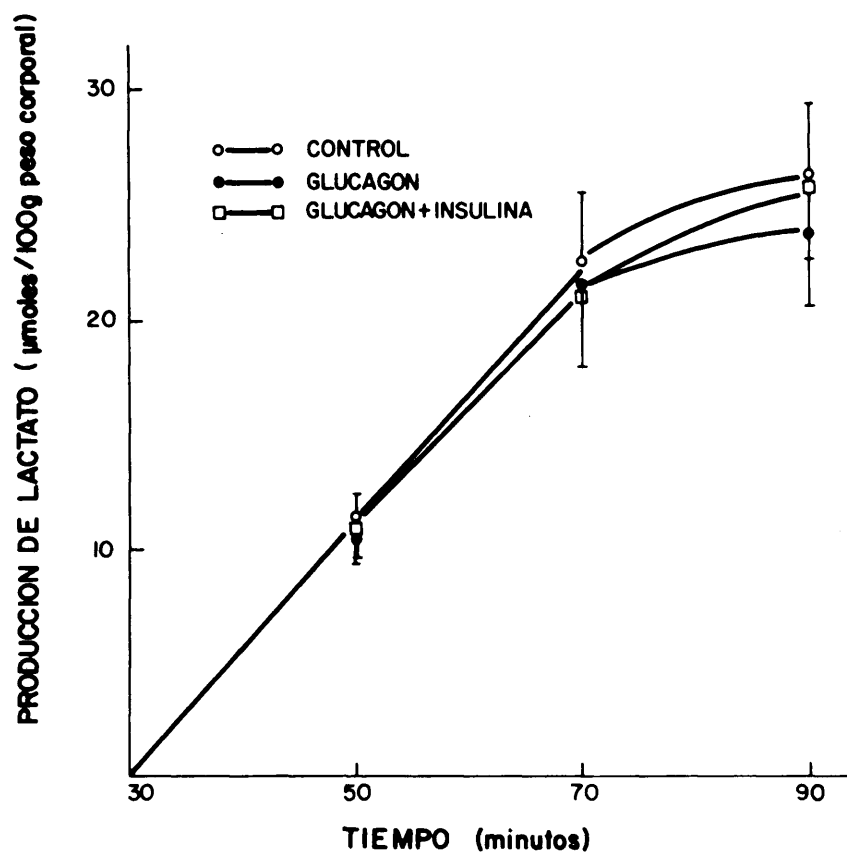


Fig. 12 .- Producción de lactato en hígados perfundidos - con L-alanina (10 mM) como sustrato. Efecto de glucagón y de glucagón más insulina. Los puntos representan valores medios de al menos ocho experimentos y las barras verticales el error tipo de la media.

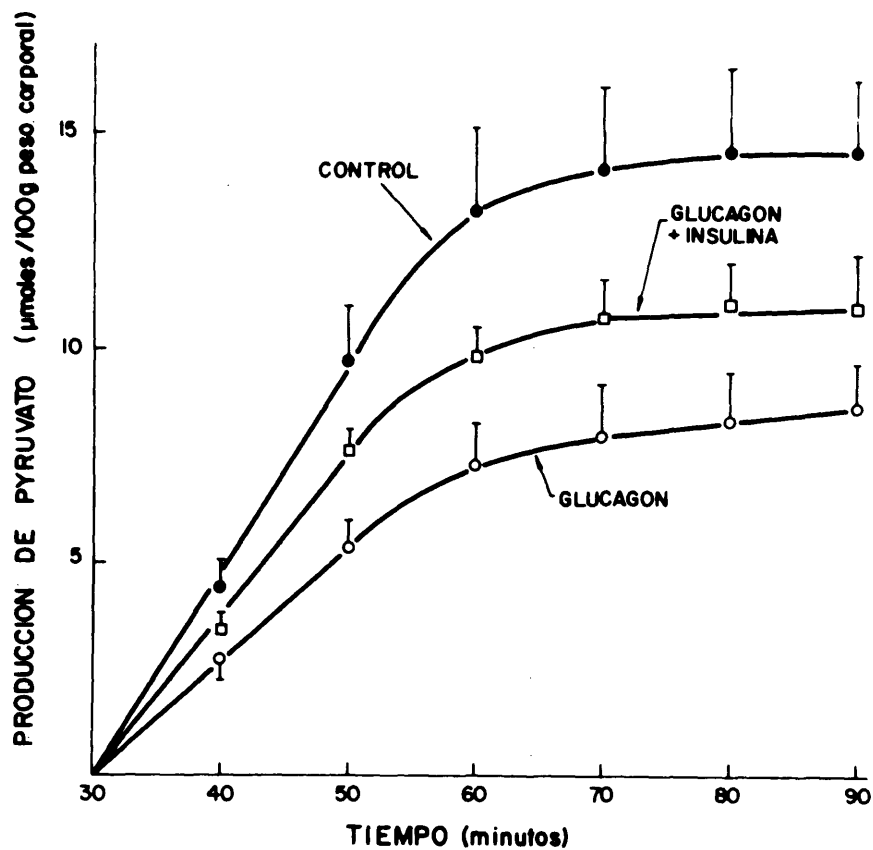


Fig. 13 .- Producción de piruvato en hígados perfundidos con L-alanina (10 mM) como sustrato. Efecto de glucagón y de glucagón más insulina. Los puntos son valores medios de al menos ocho experimentos y las barras verticales representan el error tipo de la media.

ción fué casi lineal durante los treinta primeros minutos a partir de los cuales decayó bruscamente. Prece existir - una relación inversa entre actividad gluconeogénica y producción de pyruvato. Estos patrones de producción de - pyruvato y lactato creemos deben ser interpretados como un intento de equilibrar el estado de oxidoreducción dentro y fuera de la membrana plasmática del hepatocito.

La producción de urea resultó también claramente estimulada en presencia de glucagón, mientras que la presencia de insulina disminuyó la producción de urea incluso - por debajo de los valores de control. Como puede observarse la producción de urea no es lineal durante toda la perfusión sino sólo aproximadamente en los últimos treinta minutos. Esta falta de linealidad en la producción de urea ya ha sido observada por otros autores.

En las tablas 6 y 7 tratamos de resumir los efec - tos de glucagón y de glucagón más insulina sobre el metabolismo de L-Alanina. Los flujos metabólicos, como anteriormente, los hemos calculado por diferencias en el último intervalo de 30 min. de perfusión. En estas circunstancias puede apreciarse (tabla 6) que el glucagón estimuló gluconeogénesis un 42% sobre el control y la presencia de insulina disminuyó esta cifra a solo un 11%. El cociente alanina utilizada/glucosa producida varió de 2.5 para el control a 2.2 para el grupo con glucagón. Los valores son muy aproximados a los obtenidos en los experimentos en que

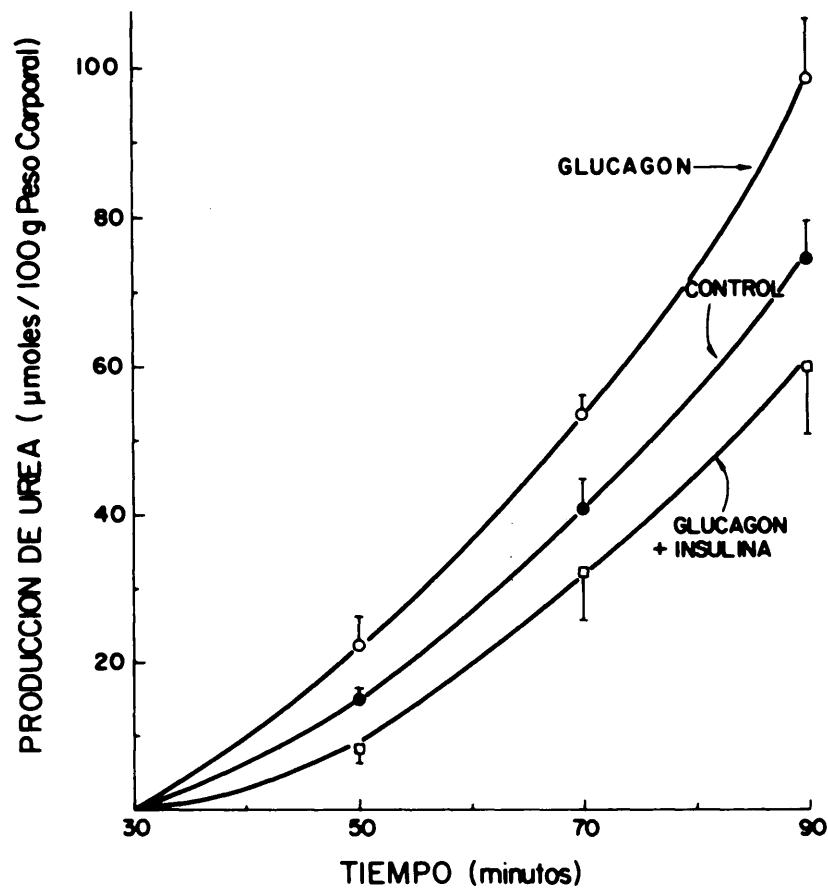


Fig. 14 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina, sobre la producción de urea en hígados perfundidos con L-alanina (10 mM). Los resultados son valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

Tabla 6 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre gluconeogé-
 sis en hígados aislados y perfundidos con L-Alanina (10 mM). Los hígados fue-
 ron preperfundidos 30 minutos antes de la adición de sustrato. El flujo glu-
 coneogénico fué calculado durante el intervalo 60-90 minutos de perfusión.
 Las cifras son valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

Adiciones	Producción de glucosa (μ moles/100 g P.C./Hr.)	% de variación	Alanina/Glucosa
Ninguna	66.98 \pm 4.4	100	2.5 \pm 0.2
Glucagón	95.52 \pm 3.4	142	2.2 \pm 0.3
Glucagón + Insulina	74.76 \pm 4.4	111	2.4 \pm 0.2

Tabla 7 .- Efecto de glucagón y de insulina más glucagón sobre el metabolismo de L-Alanina (10 mM) por hígado de rata aislado y perfundido. Los flujos metabólicos fueron calculado durante el intervalo 60-90 minutos perfusión. Las cifras son valores medios de ocho experimentos + error tipo

Adiciones	Utilización de L-Alanina	Conversión de Alanina a Glucosa	Producción de lactato	µmoles/100 g. Peso corporal/Hr.			Producción de urea
				Producción de piruvato	Alanina oxidable	Producción de urea	
Ninguna	168+19	133.96+8.8	18.8+1.5	2.7+0.12	12.5	94+8.2	
Glucagón	212+7	191.04+6.8	15.6+1.2	2.6+0.16	2.7	124+10.1	
Glucagón + Insulina	188+16	149.52+8.8	19.8+1.4	2.0+0.10	16.6	82+6.5	

* Calculado por diferencia.

utilizamos L-lactato como substrato por lo que los mismos comentarios son aplicables a este caso.

La tabla 7 trata de establecer un balance ente el substrato utilizado y los productos más importantes aparecidos en el medio de perfusión. La producción de glucosa da cuenta, como era de esperar, de la mayor parte de la alanina utilizada. Teniendo en cuenta que la síntesis de una molécula de urea requiere dos de alanina, podemos -- apreciar que la producción de urea (deaminación de alanina) da cuenta sobradamente del carbono necesario para la síntesis de glucosa, lactato y pyruvato. El hecho de que la producción de urea sea mayor que la utilización de alanina en el intervalo 60-90 min. puede ser debido a la falta de linealidad en el proceso de síntesis de urea que ha permitido la acumulación previa de grandes cantidades de amonio durante los primeros minutos de perfusión que darían lugar a que más tarde la síntesis de urea pudiera proceder a velocidades mayores que la deaminación de alanina.

Vemos de nuevo que la cantidad de substrato disponible para su oxidación es pequeña y que nunca podría dar cuenta de la energía consumida en el incremento en la producción de glucosa.

b) Intermediarios de gluconeogénesis.-

La tabla 8 muestra las concentraciones de los intermediarios de gluconeogénesis a los 60 min. de perfusión

Tabla 8 .- Concentración hepática de intermediarios de la -
 secuencia gluconeogénica tras perfusión con L-Alanina --
 (10 mM). Las adiciones de sustrato y hormonas fueron hechas
 a los 30 minutos de perfusión y los hígados fueron congela-
 dos 60 minutos más tarde y procesados según se describe en
 Métodos.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[Alanina]	45955 \pm 4083	54047 \pm 4059	46184 \pm 4098
[Lactato]	5626 \pm 375	4692 \pm 311	4573 \pm 228
[Pyruvato]	788 \pm 85	445 \pm 48	639 \pm 60
[Oxaloacetato]	18 \pm 1.7	13 \pm 0.8	18 \pm 1.1
[Malato]	616 \pm 65	697 \pm 33	625 \pm 65
[P-enol Pyruvato]	2789 \pm 427	5159 \pm 772	2846 \pm 711
[2-P-Glycerato]	585 \pm 72	923 \pm 151	535 \pm 72
[3-P-Glycerato]	6127 \pm 818	9224 \pm 1242	5819 \pm 1083
[Triosa-P]	34.3 \pm 2.8	21.9 \pm 2.3	29.6 \pm 2.8
[α -Glycerofosfato]	643 \pm 81	864 \pm 94	724 \pm 55
[Fructosa-di-P]	34.7 \pm 4.0	17.9 \pm 1.8	27.5 \pm 1.9
[Fructosa-6-P]	47.4 \pm 5.5	64.2 \pm 7.8	49.3 \pm 4.1
[Glucosa-1-P]	34.5 \pm 3.0	44.0 \pm 3.5	34.9 \pm 2.8
[Glucosa-6-P]	163 \pm 10	207 \pm 13	189 \pm 21

con L-Alanina.

En la misma tabla 8 aparecen los cambios inducidos por glucagón y por glucagón más insulina. En la fig. 15 se muestran los mismos valores representados gráficamente en forma de "cross-over".

Cualitativamente los cambios inducidos por glucagón son muy similares a los descritos con lactato como sustrato. Llama la atención los "cross-over" entre oxalacetato y PEP, así como entre fructosa-difosfato y fructosa-6-fosfato.

En la parte inferior de la misma fig. 15 podemos apreciar como en presencia de insulina prácticamente todos los cambios son revertidos o disminuidos considerablemente. La persistente elevación de hexosas-fosfato es compatible con la incompleta inhibición de gluconeogénesis observada.

c) Intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.-

Los cambios en la concentración de estos intermediarios aparecen resumidos en la tabla 9 y, gráficamente, en forma de "cross-over", en la Fig. 16. El glucagón, como puede apreciarse, produjo un aumento en la concentración de citrato, isocitrato, glutamato y aspartato y una disminución de malato oxaloacetato, acetyl-CoA y α -Ketoglutarato.

El aumento de citrato favorecería la inhibición

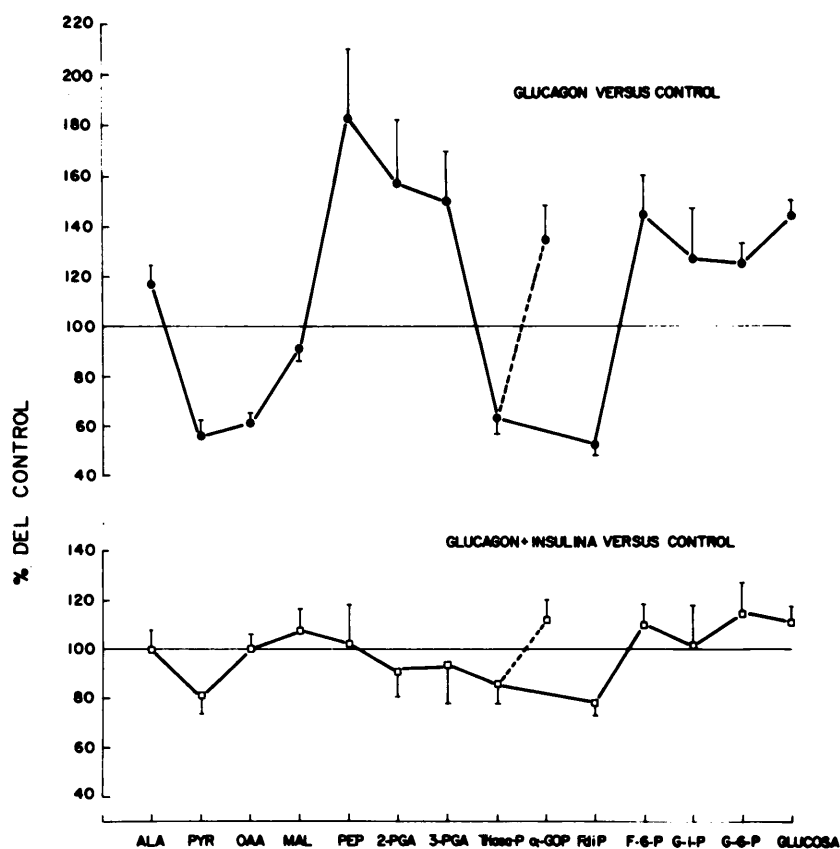


Fig. 15 .- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración de intermediarios de la secuencia - gluconeogénica en hígados perfundidos con L-Alanina (10 mM). Los valores, media de ocho observaciones \pm error tipo, son representados como porcentaje de variación respecto al control (abscisa). La línea entrecortada señala aquellos - intermediarios que no forman parte directa de la secuencia. Los hígados fueron congelados a los 60 min. de la adición de sustrato y procesados según se detalla en la sección - de Métodos.

Tabla 9 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración hepática de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en presencia de L-Alanina -- (10 mM) como sustrato. Las cifras representan valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[Malato]	616 \pm 65	697 \pm 33	625 \pm 65
[Oxalacetato]	18.11 \pm 1.7	13.24 \pm 0.8	18.30 \pm 1.1
[Acetyl-CoA]	348 \pm 22	336 \pm 17	326 \pm 35
[Citrato]	1227 \pm 181	1363 \pm 117	1281 \pm 156
[Isocitrato]	36 \pm 4.2	39 \pm 3.7	41 \pm 3.5
[α -Ketoglutarato]	529 \pm 30	460 \pm 35	614 \pm 58
[Glutamato]	10172 \pm 960	12090 \pm 895	11071 \pm 1171
[Aspartato]	13075 \pm 1290	14682 \pm 2223	10475 \pm 549

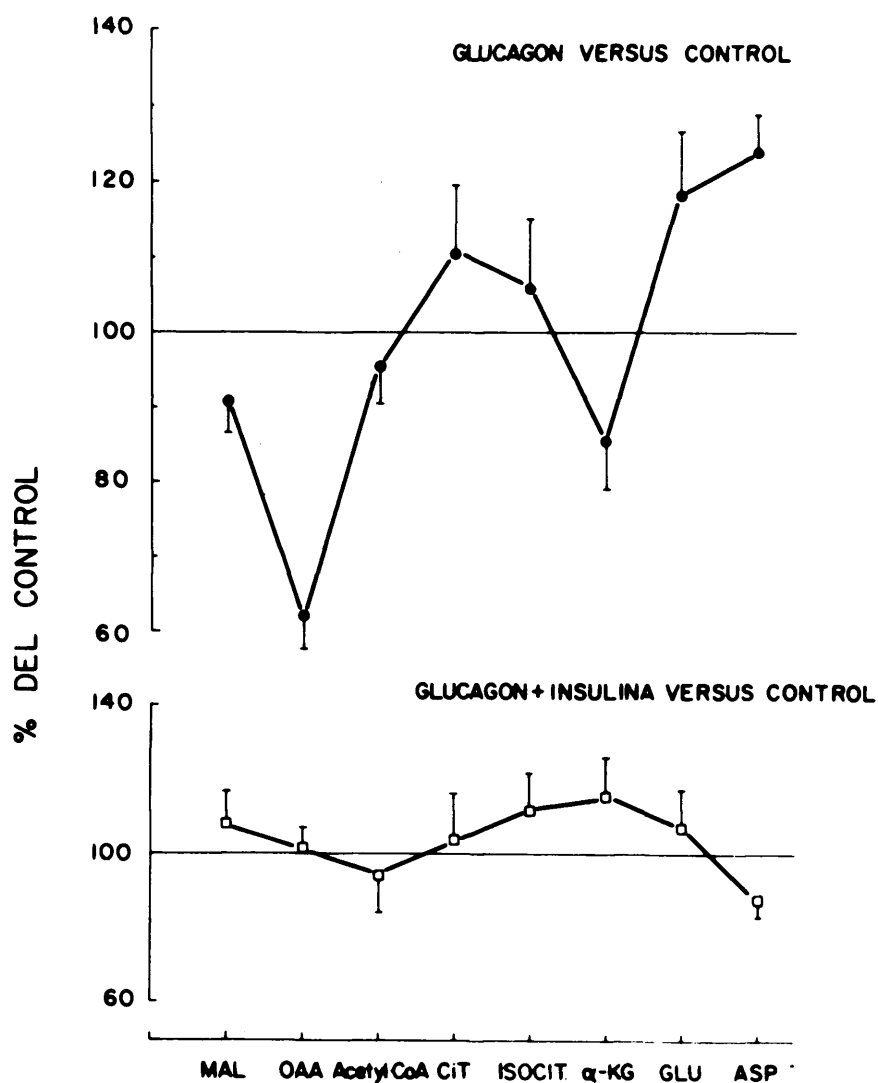


Fig. 16 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en hígados perfundidos con L-Alanina (10 mM). Los valores, media de ocho observaciones \pm error tipo, aparecen representados como porcentaje del control. Los hígados fueron congelados a los 60 min. de la adición de sustrato y procesados según describe en la sección de Métodos.

de fosfofructokinasa, hecho que sería compatible con la disminución en la concentración de fructosa-difosfato. La disminución en la concentración de acetyl-CoA y de oxaloacetato son desfavorables para explicar el flujo a través de pyruvato carboxilasa y fosfoenolpyruvato carboxikinasa. Para el primer enzima el acetyl-CoA es el modulador más importante (Utter y Scrutton, 1969a); respecto al segundo enzima dada su baja Km para el oxaloacetato (Holten y Nordlie, 1963; - Chang y col., 1966) las variaciones en la concentración de este metabolito pueden tener gran repercusión sobre el flujo a través de este enzima. La incompatibilidad de los cambios observados con el aumento de flujo gluconeogénico quizás haya que buscarla en la compartimentación celular, - es decir, es posible que en el compartimento en el que se halle el enzima se produzca un aumento de un metabolito a pesar de que veamos descender su concentración total. Vol-
veremos sobre este punto más tarde.

d) Nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno.-

Al igual que hemos visto en el grupo de hígados perfundidos con L-Lactato, el glucagón produjo una disminución del ,cociente $[ATP] / [ADP]$ y una discreta elevación en - la concentración de AMP.

El glucagón produjo un aumento en el consumo de oxígeno de 40-50 μ átomos/100 g P.C./Hr. Una vez más comprobamos que los enlaces fosfato generados por este consumo de oxígeno son inferiores a los requerimientos para dar cuen-

Tabla 10 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre el contenido en nucleótidos de adenina y consumo de oxígeno de hígados perfundidos con L-Alanina (10 mM). Las cifras son valores medios de ocho hígados + error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/p. Peso seco		
[ATP]	8418+609	6231+340	7224+528
[ADP]	2746+99	2612+235	3407+528
[AMP]	1599+185	1687+214	1634+146
[ATP] / [ADP]	2.93+0.39	2.51+0.22	2.69+0.27
$\frac{[ATP]}{[ADP] + [AMP]}$	1.71+0.23	1.67+0.317	1.35+0.23
Consumo de O ₂ * (μátomos/100 g.P.C./Hr.)	215	258	238

*Trasustracción de la respiración en ausencia de sustrato.

ta del estímulo gluconeogénico observado.

3.- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre los cocientes de acción de masas de alanina y aspartato aminotransferasas.-

Las tablas 11-14 muestran las variaciones en la concentración de reactantes y cocientes de acción de masas de alanina y aspartato aminotransferasas. Se aprecia que, a pesar de cambios acusados en algunos de los metabolitos, el cociente de acción de masas no sufrió cambios acusados bajo los distintos estímulos estando próximos siempre a los valores descritos para las constantes de equilibrio de 6.6 para la aspartato aminotransferasa (Krebs y Veech, 1969) y 1.5 - para la alanina-aminotransferasa (Krebs, 1963), la proximidad de los valores observados a las constantes de equilibrio indican que estas reacciones están próximas a su equilibrio en el tejido y que por tanto no pueden ser determinantes de aumento de flujo. A similar conclusión llegaron Parrilla y Toews (1974b) en animales intactos durante ayuno prolongado. En otras palabras, un aumento en la utilización de alanina no puede ser explicado nunca como debido a la etapa de transaminación; de igual manera, el aumento en la síntesis de urea en los hígados perfundidos con lactato no puede ser - una consecuencia de una mayor actividad transaminativa para formar aspartato y glutamato.

Finalmente, diremos que la constancia de estos valo

Tabla 11 .- Efecto de glucagón y de insulina sobre la concentración de reactantes del sistema alaninaminotransferasa en hígados aislados y perfundidos con L-Alanina (10 mM) como sustrato. Las cifras son valores medios de ocho experimentos + error tipo.

Adiciones	[Alanina]	[α-KG]	[Pyruvato]	[Glutamato]	$\frac{[ALA]}{[PYR]} \frac{[\alpha-KG]}{[GLUT]}$	
nmoles/g. Peso seco						
Ninguna	45955+4083	529+30	788+85	10172+960		3.03
Glucagón	54047+4059	460+	445+48	12090+895		4.62
Glucagón + Insulina	46184+4098	614+58	639+60	11071+118		4.00

Tabla 12 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración de reactantes del sistema alanin-aminotransferasa en hígados aislados y perfundidos con L-Lactado sódico (10 mM) como sustrato. Las cifras son valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

Adiciones	[Alanina]	[α -KG]	[Pyruvato]	[Glutamato]	$\frac{[ALA][\alpha-KG]}{[PYR][GLUT]}$
nmoles/g. Peso seco.					
Ninguna	3730 \pm 350	1768 \pm 125	995 \pm 87	9481 \pm 372	0.69
Glucagón	3120 \pm 70	2009 \pm 242	808 \pm	10297 \pm 470	0.75
Glucagón + Insulina	2610 \pm 230	1766 \pm 168	944 \pm	8981 \pm 1107	0.56

Tabla 13 .- Efectos de glucagón y de insulina sobre la concentración de reactantes del sistema aspartato-aminotransferasa en hígados aislados y perfundidos con L-Alanina (10 mM) como sustrato. Las cifras representan valores medios de ocho experimentos + error tipo.

Adiciones	[α -KG]	[Aspartato]	[Glutamato]	[Oxalacetato]	$\frac{[\alpha\text{-KG}][\text{ASP}]}{[\text{GLUT}][\text{OAA}]}$	
					nmoles/g. Peso seco.	
Ninguna	529+30	11904+1480	10172+960	18.2+1.7	33.9	
Glucagón	466+45	14682+2223	12090+895	11.2+0.8	49.5	
Glucagón + Insulina	614+58	10475+549	11071+1178	18.3+1.1	31.7	

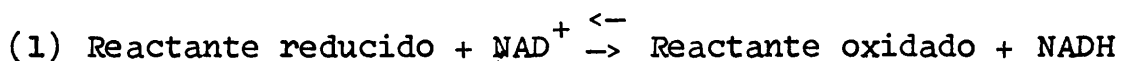
Tabla 14 .- Efectos de glucagón y de insulina sobre la concentración de reactantes del sistema aspartato--aminotransferasa en hígados aislados y perfundidos con L-Lactato sódico (10 mM) como sustrato. Las cifras representan valores medios de ocho experimentos \pm error tipo.

Adiciones	[α -KG]	[Aspartato]	[Glutamato]	[Oxalacetato]	$\frac{[\alpha\text{-KG}][\text{ASP}]}{[\text{GLUT}][\text{OAA}]}$
nmoles/g. Peso seco.					
Ninguna	1768 \pm 125	1902 \pm 155	9481 \pm 372	19 \pm 2	19
Glucagón	2009 \pm 242	1515 \pm 84	10297 \pm 470	11 \pm 1	26
Glucagón + Insulina	1766 \pm 168	1766 \pm 179	8981 \pm 1107	16 \pm 3	21

res y su proximidad a las constantes de equilibrio sirve como contraste de calidad de la tecnología utilizada en la ejecución de este trabajo.

4.- Cambios en el estado de oxidoreducción inducidos por glucagón ó glucagón más insulina.-

Dado que la mayor parte de nucleótidos de nicotina_a mida se hallan ligados a proteínas en la célula (Bücher, 1970), es evidente que la medida de su concentración total no puede dar una idea fiel del estado de oxidoreducción de la célula. Holzer y col. (1956) desarrollaron un procedimiento para poder medir la producción de $[NAD^+]$ / $[NADH]$ libre. El procedimiento, básicamente, consiste en utilizar las concentraciones de parejas de metabolitos ligados o - deshidrogenasas dependientes del sistema $NAD^+ - NADH$. Estas parejas de metabolitos y su constante de equilibrio se relacionarían con la pareja de nucleótidos de la siguiente manera:



$$(2) K_{eq} = \frac{[\text{Reac. oxid.}] \times [NADH]}{[\text{Reac. red.}] \times [NAD^+]}; \quad \frac{1}{K_{eq}} = \frac{[\text{Reac. red.}] \times [NAD^+]}{[\text{Reac. oxid.}] \times [NADH]}$$

$$(3) \frac{[NAD^+]}{[NADH]} = \frac{1}{K_{eq}} \times \frac{[\text{Reactante oxidado}]}{[\text{React. reducido}]}$$

Utilizando (3) podemos calcular la relación $[NAD^+]/[NADH]$ en citosol y en mitocondria separadamente. Para ello basta conocer la concentración de metabolitos que tomen parte en reacciones de oxidoreducción que estén próximas a su equilibrio termodinámico y cuya constante de equilibrio sea conocida. Debemos partir de las siguientes presunciones:

- 1) Sólo estableceremos relación entre parejas de metabolitos y "pool" de NAD^+ con deshidrogenasas que se encuentren localizados en un solo compartimento, citosol o mitocondria
- 2) Los componentes de la pareja elegida deben estar próximos al equilibrio bajo las condiciones estudiadas, es decir, la actividad del enzima debe ser mayor que la de aquellos otros enzimas que pudieran causar producción o desaparición de la pareja de reactantes.
- 3) Los componentes oxidado y reducido de la pareja deben de estar uniformemente distribuidos en la célula, dado que para el análisis partimos de tejido total.
- 4) La cantidad de substratos ligados a proteína debería ser despreciable.

La pareja [Lactato] / [Pyruvato] es un buen indicador del nivel de reducción del sistema $NAD^+/NADH$ citosólico ya que el enzima láctico deshidrogenasa se localiza exclusivamente en ese compartimento. La pareja [β -hidroxi-bu \bar{t} irato] / [Acetoacetato] junto con el enzima β -hidroxi-butirato deshidrogenasa (D-3-Hydroxybutyrate: NAD oxidoreductase 1.1.1.30) localizado en la membrana mitocondrial

interna y la pareja [glutamato] / [α -KG] [NH_4^+] junto con el enzima glutamato deshidrogenasa (L-Glutamate: NAD oxidoreductase (deaminating) 1.4.1.2) localizado en la matriz, reflejan los cambios en el estado de reducción del "pool" mitocondrial de NAD^+ .

Las parejas [Malato]/[Oxalacetato] ó [α -glicero - fosfato] / [Triosa-fosfato] reflejan cambios globales en el estado de reducción ya que sus respectivas deshidrogenasas están presentes en ambos compartimentos celulares.

A efectos prácticos y para valorar cambios en el estado de reducción celular resulta más cómodo manejar la relación [metabolito reducido] / [metabolito oxidado].

El glucagón aumentó el estado de reducción de los nucleótidos de nicotinamida tanto en el compartimento citosólico como en el mitocondrial. Esto fue cierto tanto para hígados perfundidos con L-Lactato (tabla 15) como con L-Alanina (tabla 16). La presencia de insulina en el medio de perfusión no permitió que se manifestaran estos -- efectos del glucagón sobre el estado de oxidorreducción.

El estado de reducción, como era de esperar, fué mayor en los hígados perfundidos con lactato. El hecho de que la pareja [Glutamato] / [α -KG] de un valor alto con alanina es debido a que esta pareja no refleja fielmente los cambios de [NAD^+] / [NADH] dado que falta el tercer reactante que es amonio, es decir, la pareja completa es [Glutamato] / [α -KG] [NH_3]. Cuando no hay aporte exógeno

Tabla 15 .- Efecto de glucagón y de insulina sobre el estado de oxidorreducción celular expresado por el cociente de parejas de metabolitos ligados a deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina en hígados perfundidos con L-lactato sódico (10 mM). Las cifras son valores medios de - ocho experimentos + error tipo.

	$\frac{[\text{LACTATO}]}{[\text{PYRUVATO}]}$	$\frac{[\text{MALATO}]}{[\text{OAA}]}$	$\frac{[\alpha\text{-GOP}]}{[\text{TRIOSA-P}]}$	$\frac{[\text{8OH-B}]}{[\text{Ac Ac}]}$	$\frac{[\text{CITRATO}]}{[\alpha\text{-KG}]}$	$\frac{[\text{GLUT}]}{[\alpha\text{-KG}]}$
Control	15.3+1.2	70+10	26.6+3.3	3.7+0.8	1.17+0.12	4.9+0.4
Glucagón	18.0+1.4	134+20	30.8+5.0	4.6+0.9	1.34+0.2	5.6+0.7
Glucagón + Insulina	13.6+1.8	95+13	23.3+4.9	3.7+0.6	1.32+0.1	4.6+0.3

Tabla 16 .- Efecto de glucagón y de insulina sobre el estado de oxidorreducción celular por el cociente de parejas de metabolitos ligados a deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina en hígados perfundidos con L-alanina (10 mM). Las cifras son valores medios de ocho experimentos + error tipo.

	$\frac{[\text{LACTATO}]}{[\text{PYRUVATO}]}$	$\frac{[\text{MALATO}]}{[\text{CAA}]}$	$\frac{[\alpha\text{-GOP}]}{[\text{TRIOSA-P}]}$	$\frac{[\text{BOH-B}]}{[\text{AC AC}]}$	$\frac{[\text{CITRATO}]}{[\alpha\text{-KG}]}$	$\frac{[\text{GLUTAMATO}]}{[\alpha\text{-KG}]}$
Control	6.9+0.7	43+3.3	20.1+4.2	0.76+	2.1+0.3	19.1+2.4
Glucagón	11.2+1.3	64+6.0	38.6+5.6	1.71+0.5	2.8+0.4	24.2+3.4
Glucagón + Insulina	7.5+0.6	50+4.0	25.5+2.4	1.32+0.1	1.9+0.2	20.6+2.9

de nitrógeno podemos prescindir del $[NH_3]$ dado que este es prácticamente invariable, pero en presencia de un aminoácido, como en el caso de la alanina, la concentración de NH_3 llega a aumentar cinco veces. Con estas consideraciones podemos comprender la aparente paradoja del aumento de la pareja $[Glutamato]/[\alpha-KG]$ en el grupo experimental de hígados perfundidos con alanina.

Similar situación respecto al estado de oxidoreducción ha podido ser apreciada al calcular el cociente $[Lactato]/[Pyruvato]$ en el medio de perfusión. La figura 17 muestra estos cambios en hígados perfundidos con lactato y la figura 18 en hígados perfundidos con L-Alanina. En el primer caso el cociente disminuyó gradualmente a lo largo de la perfusión. Durante los primeros 20-30 min. quizás el medio de perfusión no refleje fielmente los cambios intracelulares del nivel de reducción puesto que para ello sería preciso producir gran cantidad de pyruvato para equilibrar con el exceso de L-Lactato añadido al medio. Realmente así vimos que sucedía con la producción de pyruvato (figura 6). La disminución gradual que se aprecia a partir de ese tiempo con toda probabilidad es expresión de la progresiva disminución en la concentración del substrato. Cuando el substrato utilizado fue L-alanina la situación fué a la inversa; el medio de perfusión, mostró cocientes $[Lactato]/[Pyruvato]$ indicativos de un menor estado de reducción que con lactato, que, progresivamente, fueron au

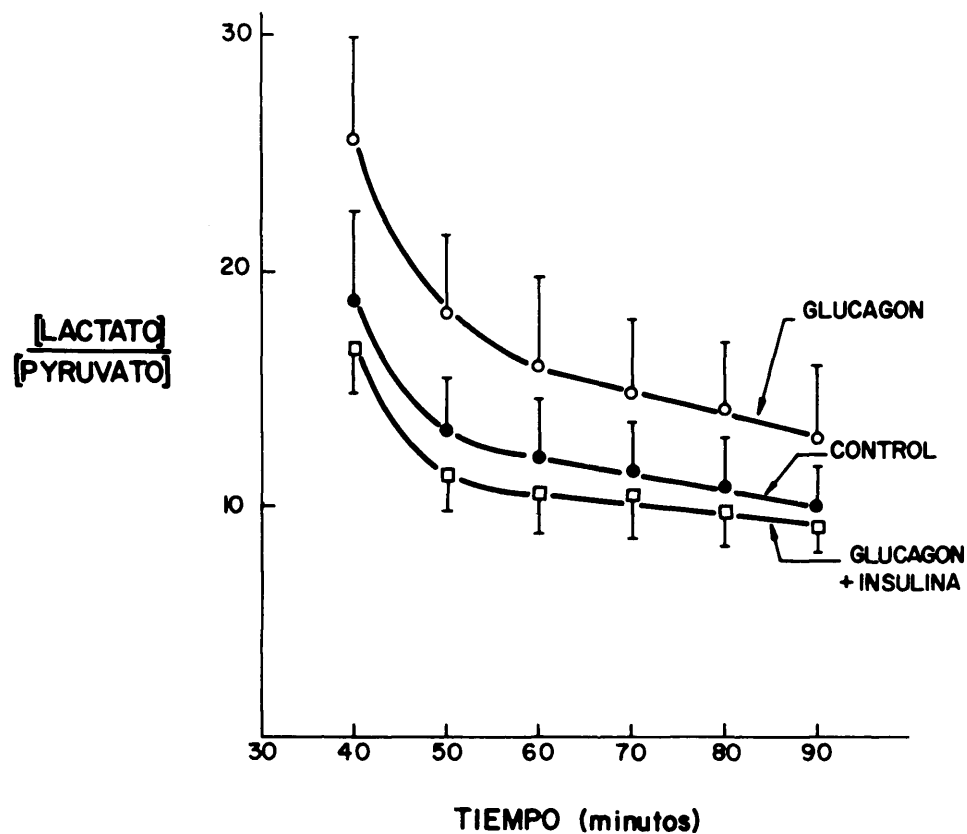


Fig. 17 .- Efectos hormonales sobre el estado de oxidoredución expresado por el cociente $[LACTATO] / [PYRUVATO]$ en el medio de perfusión. Los puntos son valores medios de al menos ocho experimentos y las barras verticales representan el error tipo de la media.

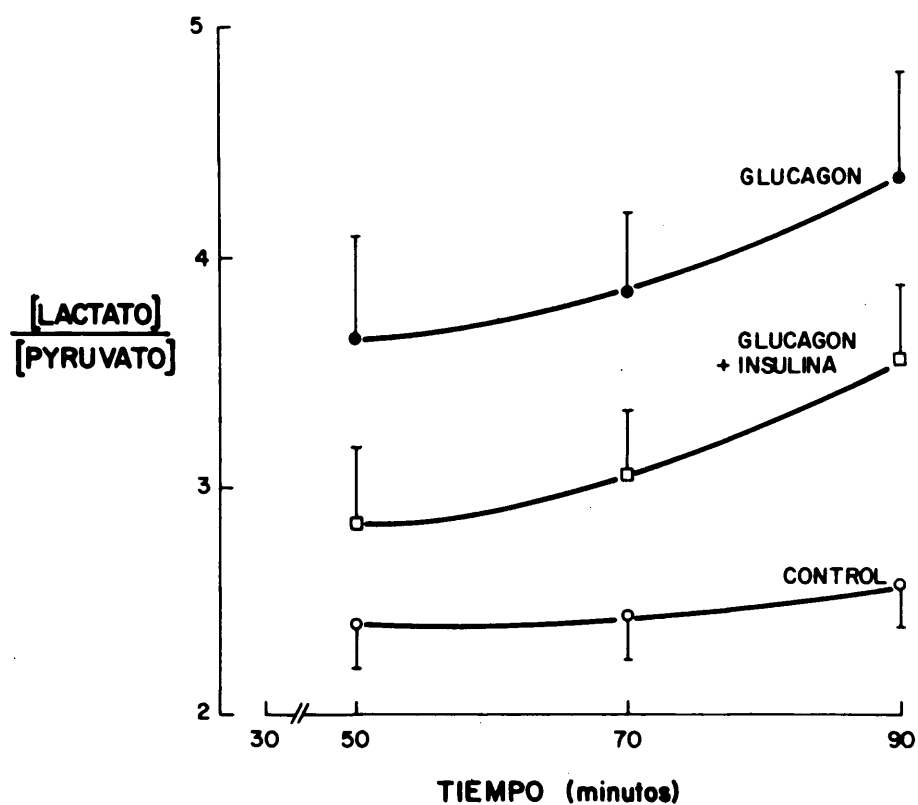


Fig. 18 .- Efectos del glucagón y de glucagón más insulina sobre el estado de oxidorreducción celular expresado por - las variaciones en el medio de perfusión del cociente $[LACTATO] / [PYRUVATO]$. Los puntos son valores medios de al menos ocho experimentos y las barras verticales representan el error tipo de la media.

mentando paralelamente a la utilización de alanina.

Indistintamente del substrato utilizado el glucagón produjo un claro efecto aumentando el cociente $[Lactato] / [Pyruvato]$ a lo largo de la perfusión, acorde con los cambios descritos previamente en el tejido.

Con la intención de valorar los efectos hormonales con independencia de efectos debidos a variaciones en la concentración de substrato, llevamos a cabo varios experimentos en los que la concentración de substrato se mantuvo constante mediante infusión continua de una solución concentrada de éste. La figura 19 muestra los efectos, en sucesión, de L-lactato, glucagón e insulina, sobre consumo de oxígeno, producción de glucosa y sobre cocientes $[Lactato] / [Pyruvato]$ y $[\beta\text{-hidroxibutirato}] / [Acetoacetato]$. La figura 20 muestra los efectos sobre idénticos parametros pero con L-alanina como substrato. En estas figuras puede apreciarse la rapidez de los cambios en el consumo de oxígeno tras la adición de glucagón así como los claros efectos de la hormona incrementando el estado de reducción en todas las condiciones estudiadas. La insulina, una vez más, revirtió casi todos los efectos sobre los parametros estudiados con excepción del cociente $[\beta\text{-OHB}] / [AcAc]$. La explicación puede venir dada por una menor permeabilidad de la membrana plasmática para estos metabolitos, que para los de la pareja $[LACT] / [PYR]$ lo que haría que los cambios intratisulares no se reflejaran en el medio de perfu-

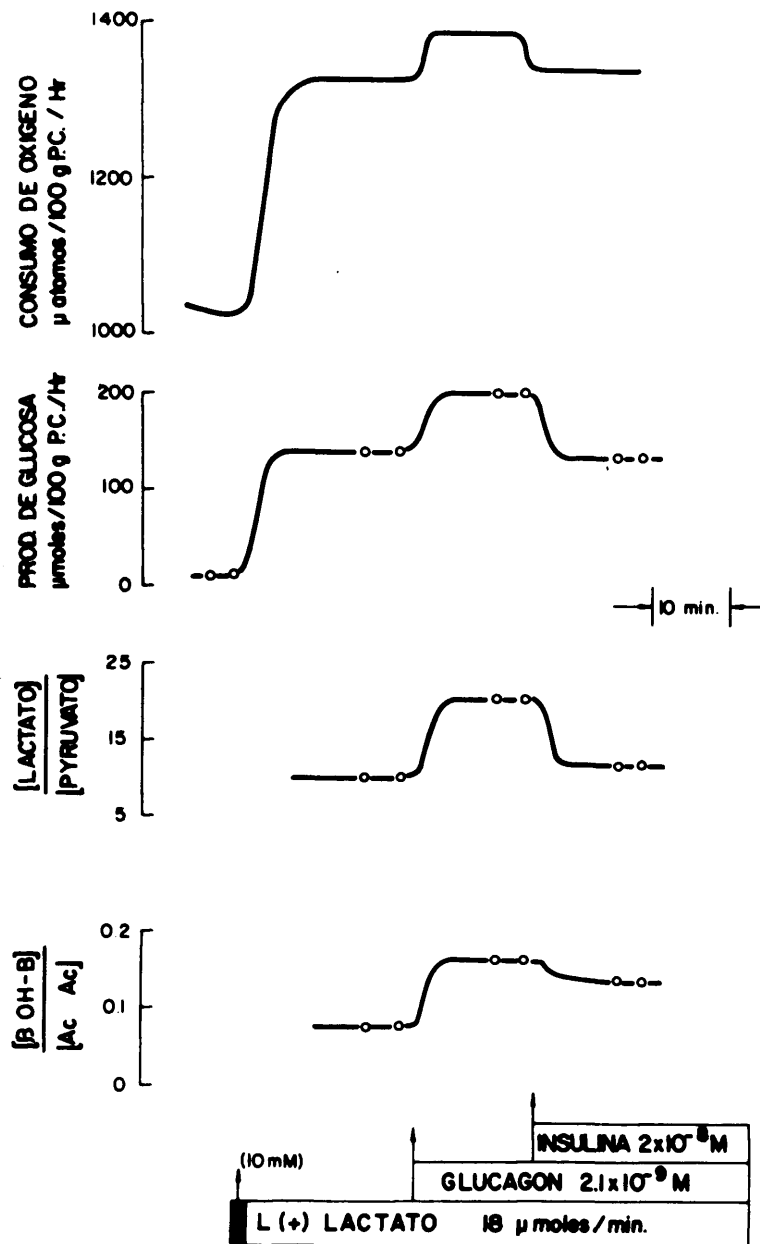


Fig. 19 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre producción de glucosa, consumo de oxígeno y cambios en el estado de oxidorreducción en el efluente hepático. El sustrato, L-Lactato sódico, fue añadido inicialmente para alcanzar una concentración de 10 mM y a partir de este momento se siguió infundiendo a un ritmo de 18 μ moles/min.

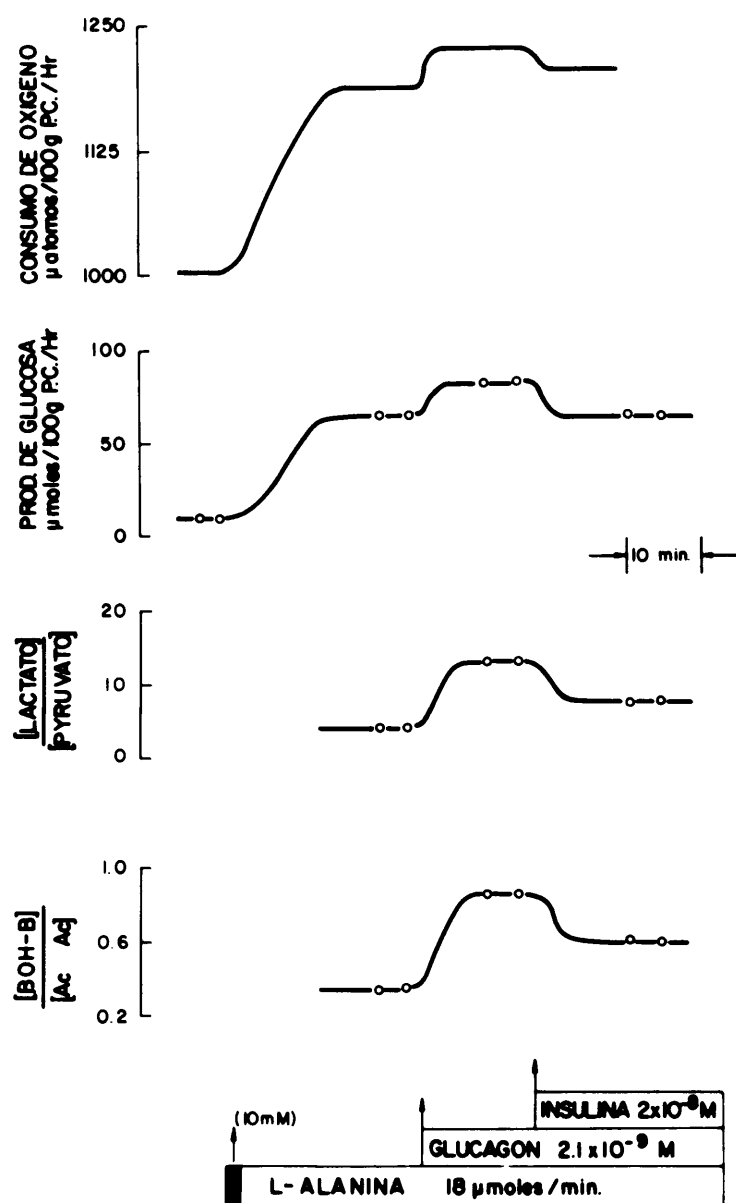


Fig. 20 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre producción de glucosa, consumo de oxígeno y cambios en el estado de oxidorreducción en el efluente hepático. El substrato, L-Alanina, fué añadido inicialmente para alcanzar una concentración de 10 mM y a partir de ese momento se siguió infundiendo a un ritmo de 18 $\mu\text{moles}/\text{min.}$

si3n con la misma celeridad en ambos casos.

5.- Efectos de glucag3n y de glucag3n m3s insulina sobre la concentraci3n celular de CoA y derivados acyl-CoA.

Acetyl-CoA es un activador obligado de pyruvato - carboxilasa (Keech y Utter, 1963) y existe suficiente evidencia de una correlaci3n entre aumentos en la concentraci3n tisular de acetyl-CoA y gluconeog3nesis (Newsholme y Gevers, 1967; Toews y col., 1970). Puesto que una de las teor3as sobre el mecanismo de acci3n del glucag3n sobre gluconeog3nesis es que ser3a consecuencia de su acci3n lipol3tica - (Williamson, 1969) hemos considerado de inter3s el estudio del efecto del glucag3n sobre la concentraci3n de CoA y derivados acyl-CoA. Las tablas 17 y 18 nos resumen los hallazgos sobre este aspecto en h3gados perfundidos con L-Lactato y L-Alanina respectivamente. Los resultados fueron muy similares independientemente del sustrato utilizado. El glucag3n en ambos casos produjo una disminuci3n en la concentraci3n de coenzima A y acetyl-CoA. Este hallazgo es contrario a la activaci3n del flujo a nivel de pyruvato carboxilasa; aunque no podemos descartar que se produjera una redistribuci3n de este intermediario que diera lugar a un aumento de su concentraci3n intramitocondrial.

Puesto que otros derivados acyl-CoA tienen gran importancia reguladora como succinil-CoA, metilmalonil-CoA propionil-CoA, entre otros, (Williamson y col., 1972) ante la imposibilidad t3cnica de medir todos estos compuestos -

Tabla 17 .- Efectos hormonales sobre la concentración en -
equilibrio de derivados de Coenzima A y de cuerpos cetónicos
en presencia de L-lactato sódico (10 mM) como sustrato. -
Las cifras representan valores medios de ocho experimentos
+ error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[Coenzima A]	412±29	375±24	332±19
[Acetyl-CoA]	347±30	268±35	335±60
[CoA soluble]	1400±207	1269±95	1342±232
[CoA insoluble]	114±24	159±14	104±22
<u>[Acetyl CoA]</u> <u>[CoA]</u>	0.86±0.1	0.75±0.12	0.94±0.2
[Otros Acyl-CoA]*	641	629	675
[β-Hidroxibutirato]	2729±297	2639±198	2668±249
[Acetoacetato]	934±162	709±123	839±120

* Calculado por diferencia entre el CoA total o soluble y
la suma de acetyl-CoA más CoA.



Tabla 18 .- Efectos hormonales sobre la concentración hepática en equilibrio de derivados de Coenzima-A y de cuerpos cetónicos en presencia de L-Alanina (10 mM) como sustrato. Los valores son medias de ocho experimentos \pm error tipo.

	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
	nmoles/g. Peso seco		
[Coenzima-A]	418 \pm 43	330 \pm 14	333 \pm 22
[Acetyl-CoA]	348 \pm 22	336 \pm 17	326 \pm 35
[CoA Soluble]	1350 \pm 109	1340 \pm 179	1386 \pm 123
[CoA Insoluble]	168 \pm 15	158 \pm 3	159 \pm 9
$\frac{[\text{Acetyl-CoA}]}{[\text{CoA}]}$	0.86 \pm 0.07	1.03 \pm 0.08	0.98 \pm 0.09
[Otros Acyl-CoA] *	584	674	727
[β -Hidroxibutirato]	1572 \pm 120	1746 \pm 190	2062 \pm 185
[Acetoacetato]	2238 \pm 195	2113 \pm 264	1473 \pm 138

* Calculado por diferencia entre el CoA total o soluble y la suma de acetyl-CoA más CoA.

hemos tratado de averiguar si en presencia de glucagón se producían cambios cuantitativos en la concentración de estos intermediarios derivados acilados de CoA. Para ello hemos seguido el siguiente proceder: Medir como CoA, tras hidrólisis alcalina, la totalidad del acyl-CoA de cadena larga. Llamamos también a este CoA, total o soluble, por ser extraído del tejido ^{con}ácido a diferencia de aquel que - con ese tratamiento precipita por estar ligado a proteínas.

La diferencia entre el CoA soluble o total y la suma de CoA libre más acetil-CoA no da una estimación de las variaciones globales de otros derivados CoA no medibles. Vemos, pues, que en presencia de L-Alanina (Tabla 18) el glucagón aumentó la concentración de otros acyl-CoA lo que pudiera explicar que entre ellos hubiera algún otro activador de pyruvato carboxilasa, como, por ejemplo, propionyl-CoA (Utter y col., 1964), que explicara la activación gluconeogénica. El hecho de que en presencia de insulina, que disminuyó efectivamente el efecto gluconeogénico del glucagón, los cambios fueron similares al grupo con glucagón sólo, hace considerablemente difícil poder interpretar los cambios de flujo a través de pyruvato carboxilasa en relación a los cambios de estos intermediarios. Por su - puesto, nunca podemos descartar la posibilidad de cambios cualitativos que actualmente no hemos podido apreciar.

En presencia de L-lactato como sustrato (tabla 17) la disminución en CoA libre y acetyl-CoA fué aún más acusa

da y en este caso no hubo cambios aparentes en la concentración de acyl-CoA no medidos.

La falta de efecto del glucagón elevando la concentración de acetyl-CoA ha sido también comunicada por otros autores aunque en condiciones experimentales distintas a las nuestras (Menahan y col., 1968).

No debemos descartar la alternativa de que la concentración intramitocondrial de acetyl-CoA sea siempre superior (Williamson y col., 1968) a la constante de activación del enzima aislado.

6.- Efectos hormonales sobre la distribución intracelular de metabolitos.-

La aplicación de los mismos fundamentos descritos previamente para la medida del $[NAD^+]$ / $[NADH]$ libre (ver pag. 77) ha servido de base para tratar de establecer patrones cualitativos de distribución intracelular de metabolitos. En algunas de las publicaciones recientes sobre el tema vemos que las presunciones hechas para los cálculos son diversas y lo que es más importante, probablemente incorrectas. Así por ejemplo, Williamson, Lund y Krebs (1967) calcularon la distribución intracelular de oxalacetato bajo la presunción de que malato estaría distribuido uniformemente en la célula. De igual manera Williamson, J.R. (1969) partió de la base de que glutamato y aspartato estarían distribuidos uniformemente para así poder calcular la distribu --

ción de α -ketoglutarato. Greenbaum y col. (1971) han publicado recientemente un análisis crítico sobre las distintas alternativas a seguir para el cálculo de la distribución intracelular de metabolitos.

La importancia de estas medidas ha sido recalcada en los apartados anteriores y volveremos sobre ella en la discusión de este trabajo.

a) Procedimiento de cálculo de la distribución intracelular de metabolitos.-

Malato y oxalacetato.

Partimos de la presunción de que malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH) están en equilibrio con un mismo "pool" de NAD citosólico y que malato deshidrogenasa mitocondrial está en equilibrio con β -hidroxibutirato deshidrogenasa por medio de un mismo "pool" de NAD^+ mitocondrial. Como hemos señalado previamente láctico deshidrogenasa se halla presente sólo en el citosol (c) mientras que β -hidroxibutirato deshidrogenasa sólo en la mitocondria (m). Por tanto podemos establecer las siguientes relaciones:

$$(1) ([\text{Malato}] / [\text{Oxalacetato}])_c = \frac{[\text{Lactato}]}{[\text{Pyruvato}]} \times \frac{K_{\text{LDH}}}{K_{\text{MDH}}}$$

$$(2) ([\text{Malato}] / [\text{Oxalacetato}])_m = \frac{[\beta\text{-hidroxi-butirato}]}{[\text{Acetoacetato}]} \times \frac{K_{\text{OHB DH}}}{K_{\text{MDH}}}$$

A estas ecuaciones llegamos partiendo según acabamos de describir de :

$$\frac{[NAD^+]}{[NADH]}_{\text{citosólico}} = \frac{1}{K_{LDH}} \times \frac{[Pyruvato]}{[Lactato]}$$

$$\frac{[NAD^+]}{[NADH]}_{\text{citosólico}} = \frac{1}{K_{MDH}} \times \frac{[Oxalacetato]_c}{[Malato]_c}$$

Igualando los segundo términos de ambas ecuaciones y reagrupando llegaríamos a la ecuación (1) .

K_{LDH} , K_{MDH} y $K_{\beta OHBDH}$ son las constantes de equilibrio de láctico deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y β -hidroxibutirato deshidrogenasa respectivamente. Para los cálculos hemos tomado los valores de estas constantes determinados por Williamson, D.H. y col., (1967): 1.11×10^{-4} para K_{LDH} , 2.78×10^{-5} para K_{MDH} y 4.93×10^{-2} para $K_{\beta OHBDH}$, a pH 7.0, 38°C y fuerza iónica de 0,25.

Puesto que el malato y oxalacetato totales son medidos experimentalmente tenemos:

$$(3) [Malato]_{\text{total}} = [Malato]_c + [Malato]_m$$

$$(4) [Oxalacetato]_{\text{total}} = [Oxalacetato]_c + [Oxalacetato]_m$$

Combinando las ecuaciones (1) - (4) podemos despejar las cuatro incógnitas.

Cálculo de la distribución de glutamato y aspartato

Para calcular la distribución de estos metabolitos partimos de las siguientes presunciones: (a) que glutámico oxalacético transaminasa (GOT) está en equilibrio en ambos compartimentos; (b) que el amonio está distribuido uniformemente en el agua intracelular y (c) que β -hidroxibutirato deshidrogenasa (β -OHBDH) y glutamato deshidrogenasa (GDH) están en equilibrio con el mismo pool de NAD^+ libre.

Evidencia experimental sobre este último punto ha sido presentada recientemente por Parrilla y Goodman (1974).

Las etapas a seguir en el cálculo serían, pues, -+ las siguientes:

$$(5) [\alpha\text{-Ketoglutarato}]_m = \frac{[\text{Glutamato}]_m \times [\text{Oxalacetato}]_m}{[\text{Aspartato}]_m} \times K_{\text{GOT}}$$

$$(6) [\alpha\text{-Ketoglutarato}]_m = \frac{[\text{Glutamato}]_m}{[\text{NH}_4]} \times \frac{[\text{NAD}^+]_m}{[\text{NADH}]_m} \times K_{\text{GDH}}$$

Podemos cambiar estas dos ecuaciones con lo que:

$$(7) [\text{Aspartato}]_m = [\text{Oxalacetato}]_m \times \frac{[\text{NADH}]_m}{[\text{NAD}^+]_m} \times [\text{NH}_4] \times \frac{K_{\text{GOT}}}{K_{\text{GDH}}}$$

Y substituyendo por nivel de reducción del $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ mitocondrial tendremos:

$$(9) \text{ [Aspartato] }_m = \text{ [Oxalacetato] }_m \times \frac{[\beta\text{OHButirato}]}{[\text{Acetoacetato}]} \times K_{\text{OHBDH}} \times \\ \times \text{NH}_4 \times \frac{K_{\text{GOT}}}{K_{\text{GDH}}}$$

Tenemos también que:

$$(9) \text{ [Aspartato] }_c = \text{ [Aspartato] }_{\text{total}} - \text{ [Aspartato] }_m$$

Para K_{GOT} tomamos el valor 6.6 (Krebs y Veech, 1969)

$$(10) \text{ [}\alpha\text{-Ketoglutarato] }_{\text{total}} = \text{ [}\alpha\text{-Ketoglutarato] }_c + \text{ [}\alpha\text{-Ketoglu} \\ \text{tarato] }_m$$

Substituyendo (5) y (6) en la ecuación (10) obten -
dremos:

$$(11) \text{ [}\alpha\text{-KG] }_{\text{total}} = \frac{[\text{Glut}]_c \times [\text{OAA}]_c \times K_{\text{GOT}}}{[\text{Aspartato}]_c} + \\ + \frac{[\text{Glut}]_m \times [\text{OAA}]_m \times K_{\text{GOT}}}{[\text{Aspartato}]_m}$$

Para K_{GDH} tomamos el valor 3.87×10^{-6} M.

$$(12) \quad [\text{Glutamato}]_m = [\text{Glutamato}]_{\text{total}} - [\text{Glutamato}]_c$$

Substituyendo (12) en 11)

$$(13) \quad [\alpha\text{-KG}]_{\text{total}} = \frac{[\text{Glut}]_c \times [\text{OAA}]_c \times K_{\text{GOT}}}{[\text{Aspartato}]_c} +$$

$$+ \frac{[\text{Glut}]_t - [\text{Glut}]_c \times [\text{OAA}]_m \times K_{\text{GOT}}}{[\text{Aspartato}]_m}$$

Esta ecuación nos puede dar a conocer el Glutamato citosólico, y por diferencia con el total obtendremos el mitocondrial

$$(14) \quad [\text{Glutamato}]_m = [\text{Glutamato}]_t - [\text{Glutamato}]_c$$

Cálculo de la distribución de α -Ketoglutarato

Para este fin nos valemos una vez más del equilibrio de glutámico oxalacético transaminasa.

$$(15) \quad [\alpha\text{-Ketoglutarato}]_c = \frac{[\text{Glutamato}]_c \times [\text{Oxalacetato}]_c}{[\text{Aspartato}]_c} \times$$

$$\times K_{\text{GOT}}$$

$$(16) [\alpha\text{-Cetoglutarato}]_m = \frac{[\text{Glutamato}]_m \times [\text{Oxalacetato}]_m}{[\text{Aspartato}]_m} \times K_{\text{GOT}}$$

De estas ecuaciones todos los términos de la derecha han sido previamente calculados.

Cálculo de la distribución de isocitrato

Hemos calculado el contenido citosólico en isocitrato partiendo de la presunción de que la isocitrato deshidrogenasa citosólica (Threo-Ds-Isocitrate: NADP oxidoreductase (decarboxilating) 1.1.1.42) y el enzima málico -- (L-Malate: NADP oxidoreductase (decarboxilating) 1.1.1.40) estén en equilibrio con el mismo "pool" de NADP citosólico.

Combinando las ecuaciones de equilibrio del enzima málico e isocitrato deshidrogenasa podemos despejar [Isocitrato]_c :

$$(17) [\text{Isocitrato}]_c = \frac{[\alpha\text{-Ketoglutarato}]_c [\text{Malato}]_c}{[\text{Pyruvato}]_c} \times \frac{K_{\text{EM}}}{K_{\text{IDH}}}$$

La constante del enzima málico, K_{EM} , a pH 7.0, 38°C y una fuerza iónica de 0,25 es igual a 3.44×10^{-2} M; K_{IDH} , la

constante de IDH, es igual a 0,91 (Krebs y Veech, 1969).

Por diferencia con el total podemos calcular [Isocitrato]_m

$$(18) \quad [\text{Isocitrato}]_m = [\text{Isocitrato}]_t - [\text{Isocitrato}]_c$$

Cálculo de la distribución de citrato

Partimos de la presunción de que el enzima aconitasa (citrate (isocitrate) hydro-lyase 4.2.1.3) se halla en equilibrio en ambos compartimentos, con lo que:

$$(19) \quad [\text{Citrato}]_c = \frac{[\text{Isocitrato}]_c}{K_{\text{aconitasa}}}$$

$$(20) \quad [\text{Citrato}]_m = \frac{[\text{Isocitrato}]_m}{K_{\text{aconitasa}}}$$

Eventualmente podríamos calcular uno de ellos por diferencia con el total

$$(21) \quad [\text{Citrato}]_m = [\text{Citrato}]_t - [\text{Citrato}]_c$$

Para $K_{\text{aconitasa}}$ tomamos un valor de 4.7×10^{-2} M (Williamson, 1969).

Obviamente la proporción de metabolitos en cada compartimento no nos aclara nada sobre su concentración real para lo cual es preciso conocer el volumen en que se encuentran diluidos. Para esto necesitamos conocer el volumen de agua intramitocondrial y citosólica, los cuales hemos calculado partiendo de los siguientes datos:

a) La proporción húmedo/seco del tejido resultó ser de 4,94 (pág.44) lo que nos permite calcular los mililitros de agua por gramo de peso de tejido seco.

b) El agua intracelular presumimos sería el 65% del agua total.

c) El agua mitocondrial sería $0.8 \mu\text{l}/\text{mg}$ proteína (Klingenberg y Pfaff, 1966) y un contenido total en mitocondria de $60 \text{ mg proteína/g peso húmedo}$ (Sholz y Bucher, 1965). Con todos estos datos llegamos a calcular un espacio de agua en citosol de $2.323 \text{ ml/g peso seco}$ y en mitocondria de $0.237 \text{ ml/g peso seco}$, que son los que hemos usado para nuestros cálculos.

b) Distribución intracelular de metabolitos en hígados perfundidos con L-Lactato.

Las tablas 19 y 20 muestran las concentraciones de metabolitos en citosol y en mitocondria respectivamente. Los gradientes mitocondria:Citosol bajo las distintas situaciones experimentales aparecen descritos en la tabla 21.

La perfusión con L-Lactato da lugar a una concen -

Tabla 19 .- Efecto de glucagón y de insulina más glucagón sobre la concentración citosólica de metabolitos en hígados perfundidos con L-Lactato sódico (10 mM). En el texto aparece detallado el procedimiento de cálculo.

	Control		Glucagón		Glucagón + Insulina	
	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM
[Malato]	1098	0.47	765	0.33	944	0.41
[Oxalacetato]	19	0.008	11	0.005	16	0.007
[Citrato]	1721	0.74	1672	0.72	1560	0.67
[Isocitrato]	80.9	0.034	78.6	0.033	73.36	0.031
[α -Ketoglutarato]	1762	0.76	1996	0.86	1764	0.75
[Glutamato]	9266	3.9	7132	3.07	8400	3.6
[Aspartato]	1822	0.78	1030	0.44	1604	0.69

Tabla 20 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración intramitocondrial de metabolitos en hígados perfundidos con L-Lactato só dico (10 mM). En el texto aparece detallado el procedimiento de cálculo.

	Control		Glucagón		Glucagón + Insulina	
	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM
[Malato]	87	0.37	569	2.4	304	1.28
[Oxalacetato]	0.02	0.00008	0.07	0.00029	0.03	0.00013
[Citrato]	396	1.6	845	3.5	641	2.7
[Isocitrato]	10.23	0.043	53.36	0.22	20.5	0.086
[α -Ketoglutarato]	1.02	0.0043	12	0.05	2.3	0.0097
[Glutamato]	2.5	0.9	3164	13.3	581	2.4
[Aspartato]	79	0.33	484	2.04	161	0.67

tracción mitocondrial más elevada de citrato e isocitrato mientras que en el citosol predominan malato, oxalacetato, glutamato, aspartato y α -Ketoglutarato.

La presencia de glucagón dió lugar a una disminución en el citosol de todos los metabolitos calculados (tabla 19) y su aumento en el compartimento mitocondrial (tabla 20) con la excepción del α -Ketoglutarato que aumentó en ambos dado lugar por consiguiente a un aumento en el gradiente mitocondria:citosol (tabla 21).

Resultaron particularmente notables los cambios sobre malato, glutamato y aspartato cuyo gradiente superó la unidad. El aumento en unas diez veces en el gradiente de malato, de 0,78 a 7,27, hace de este ^{el} cambio más notable inducido por la hormona ya que la concentración de este metabolito pasa a ser de claro predominio intramitocondrial con las implicaciones que esto pueda tener en regulación.

Puesto que la concentración total de malato no cambia substancialmente, parece que el glucagón podría actuar activando el transporte de malato al interior de la mitocondria; aunque también entre dentro de lo posible, que este movimiento de malato sea forzado por la salida de fosfato o de algún anión dicarboxílico.

c) Distribución intracelular de metabolitos en hígados perfundidos con L-alanina.

La perfusión con L-Alanina produce los siguientes

Tabla 21.- Gradientes de concentración de metabolitos entre mitocondria y citosol en hígados perfundidos con L-Lactato sódico (10 mM). Las cifras representan concentración de metabolitos en mitocondria: concentración en citosol, calculado según se describe en el texto.

Metabolito	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
Malato	0.78	7.27	3.12
Oxalacetato	0.01	0.06	0.02
Citrato	2.16	4.86	4.02
Isocitrato	1.26	6.66	2.77
α -Ketoglutarato	0.0056	0.058	0.012
Glutamato	0.23	4.33	0.66
Aspartato	0.42	4.6	0.97

cambios en la distribución hepática de metabolitos con respecto al L-Lactato.

En el citosol (Tabla 22) disminuyen malato, citrato e isocitrato y α -cetoglutarato, mientras que aumenta discretamente glutamato y en forma muy acusada aspartato. En la mitocondria se produce un aumento de todos los metabolitos respecto al control con lactato. La disminución citosólica de α -cetoglutarato y el aumento de glutamato y aspartato es acorde con el hecho de que la transaminación de alanina para dar piruvato es un proceso que sólo tiene lugar en el citosol. Este proceso utiliza α -cetoglutarato y produce glutamato que asimismo por transaminación da lugar a aspartato.

Los gradientes mitocondria:citosol indican (Tabla 24) una mayor concentración mitocondrial de malato, isocitrato y citrato. Este gradiente de malato sugiere que, durante la gluconeogénesis a partir de L-alanina, los equivalentes de reducción y el carbono son transportados al citosol como malato.

La acción del glucagón en estas circunstancias se caracteriza por disminuir en forma significativa las concentraciones de oxalacetato y α -cetoglutarato en el citosol, al tiempo que aumenta las de citrato, isocitrato y aspartato. En mitocondria se produce una disminución de citrato e isocitrato junto con aumento de todos los demás. Estos cambios dan lugar a una elevación en el gradiente mitocondria-citosol de todos los metabolitos con excepción de ci-

Tabla 22 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la concentración citosólica de metabolitos en hígados perfundidos con L-Alanina (10 mM). En el texto aparece detallado el procedimiento de cálculo.

	Control		Glucagón		Glucagón + Insulina	
	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM
[Malato]	515	0.22	543	0.23	520.	0.22
[Oxalacetato]	18.12	0.0078	12.91	0.0055	18.22	0.0078
[Citratato]	304	0.13	488	0.21	436	0.19
[Isocitratato]	14.32	0.0061	22.96	0.0099	20.5	0.0089
[α -Ketoglutarato]	527	0.22	452	0.19	607	0.26
[Glutamato]	9949	4.27	9916	4.27	10712	4.6
[Aspartato]	11596	4.99	14005	6	10177	4.3

Tabla 23 .- Efecto de glucagón y de insulina sobre la concentración intramitocondrial de metabolitos en hígados perfundidos con L-Alanina - (10 mM). En el texto aparece detallado el procedimiento de cálculo.

	Control		Glucagón		Glucagón + Insulina	
	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM	nmoles/g	mM
[Malato]	100	0.42	153.6	0.64	104	0.44
[Oxalacetato]	0.075	0.00031	0.085	0.00036	0.072	0.0003
[Citrato]	922	3.8	874	3.6	844	3.5
[Isocitrato]	22.6	0.095	16.31	0.068	21.1	0.088
[α -Ketoglutarato]	2	0.008	8	0.033	6	0.025
[Glutamato]	222	0.94	2173	9.17	358	1.5
[Aspartato]	307.7	1.2	676	2.8	298	1.25

Tabla 24 .- Gradientes de concentración de metabolitos entre mitocondria y citosol en hígados perfundidos con L-Alanina (10 mM). Las cifras representan concentración de metabolitos en mitocondria: concentración en citosol, calculado según se detalla en el texto.

Metabolito	Control	Glucagón	Glucagón + Insulina
Malato	1.91	2.78	2
Oxalacetato	0.04	0.065	0.038
Citrato	29.2	17.14	18.42
Isocitrato	15.57	6.8	9.88
α -Ketoglutarato	0.038	0.17	0.096
Glutamato	0.21	2.14	0.32
Aspartato	0.24	0.46	0.29

trato e isocitrato que disminuyen.

7.- Efectos de glucagón y de glucagón más insulina sobre la captación hepática de potasio.-

La primera observación de efectos hormonales sobre la kaliemia se remonta a 1923 en que Harrop y Benedict comunicaron que la inyección de insulina a humanos normales producía una caída de los niveles plasmáticos de potasio. Otros muchos autores hicieron observaciones similares trabajando en preparaciones aisladas de músculos esqueléticos (Leupin y Verzas, 1950; Andres y col., 1962), es decir, la administración de insulina hacía disminuir los niveles de potasio del medio de incubación. De forma indirecta Groen y col. (1951) llegaron a los mismos resultados tras la administración de glucosa que estimularía la secreción de insulina endógena.

En contraste con este efecto insulínico favoreciendo la entrada de potasio a los tejidos, el glucagón parece actuar en sentido opuesto (Wolfson y Ellis, 1956; -- Shoemaker y Finder, 1961).

Nuestros hallazgos a este respecto aparecen resumidos en la tabla 25, en que se muestran las concentraciones de potasio al final de la perfusión en cada situación experimental. La columna de la derecha muestra los cambios respecto al control inducidos por el glucagón o por la combinación de glucagón más insulina. Estos resultados, con

Tabla 25 .- Efecto de glucagón y de glucagón más insulina sobre la captación hepática de potasio. La medición se hizo en muestras tomadas a los 90 minutos de perfusión. Las cifras son valores medios de ocho observaciones, compuestas por un número similar de experimentos en que el sustrato fuera L-alanina o L-lactato sódico.

	[K ⁺] (mEq/l)	Captación de K ⁺ (μEq/g hígado/Hr.)
Control	6.12±0.14	--
Glucagón	6.33±0.28	-3
Glucagón + Insulina	6.03±0.13	+1.3

hígado de rata aislado, son similares a los previamente descritos con otros tejidos aislados o animales intactos. Vemos que, en nuestras condiciones experimentales, la insulina revierte totalmente el efecto del glucagón llegando incluso a producir en su presencia una captación de 1,3 $\mu\text{Eq/g}$ hígado/Hr.

DISCUSSION

DISCUSION

Significación fisiológica del efecto gluconeogénico del glucagón.-

Antes de pasar a discutir los mecanismos íntimos de los fenómenos que hemos observado, consideramos oportuno hacer un análisis global de los resultados y su posible importancia fisiológica.

La adición de glucagón produjo estímulos de gluconeogénesis variables según el substrato utilizado, pero, en cualquier caso, consistentes. Los siguientes argumentos apoyan que se trata de auténtica neoformación de glucosa y no de glucogenolisis. En primer lugar, la utilización de animales ayunados hace que el poco glucógeno que aún almacenan no pudiera dar cuenta del incremento en la producción de glucosa. En segundo lugar, los balances de carbono indicaron que la utilización de substratos podía dar cuenta de toda la glucosa producida. Admitido, que el glucagón estimule la producción de glucosa, de alguna forma que a continuación pasaremos a analizar, queda por interpretar el valor fisiológico de estos hallazgos debido a las condiciones artificiosas del hígado aislado y perfundido. Como hemos señalado en la introducción de este trabajo, existe una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de glucagón e insulina en situacio-

nes caracterizadas por hiper o hipoproducción de glucosa. En individuos normales estos extremos vienen determinados por la ingestión de alimento cuya cantidad, calidad y frequencia determinarán el patrón hormonal más adecuado para controlar aquellas funciones que ayuden a subvenir las necesidades orgánicas inmediatas y acumular o movilizar combustible orgánico según la situación.

Parece, pues, que la acción del glucagón para que posea significación fisiológica no debería ser separada de su acción conjunta con la insulina. Este hecho ya fue advertido por diversos autores como Macknall y Sokal (1969), Parrilla y col. (1972), Parrilla y col. (1974 b), entre - otros. Estos últimos autores utilizaron como índice para valorar el efecto de ambas hormonas su relación molar y estudiaron los efectos de variaciones del cociente Glucagón/Insulina dentro de un amplio rango, sobre diversos parámetros funcionales. Llegaron a la conclusión de que relaciones molares entre 2.6 y 0.26, considerados dentro del rango fisiológico, abolían todos los efectos del glucagón. Los máximos efectos de glucagón pudieron observarse con cocientes por encima de 2.600. Considerando que durante el ayuno el cociente glucagón/insulina (según datos de Unger y col.) es de 2.5, esto sugiere que, si los datos obtenidos con órganos aislados fueran extrapolables a la situación in vivo, el glucagón tendría poca importancía como hormona gluconeogénica. Obviamente, se necesi

ta mucho trabajo para poder llegar a valorar con exactitud todos estos datos bajo el punto de vista fisiológico. Algunas de las dificultades residen en que no es fácil conocer la concentración real de estas hormonas a nivel del hepatocito por dos razones: primera, que la sangre portal es diluida con sangre de la arteria hepática y que, en segundo lugar, desconocemos la apetencia de los distintos tipos celulares por estas hormonas.

En el presente trabajo hemos utilizado concentraciones de glucagón e insulina que proporcionaron un cociente G/I de 0.2, el cual dió lugar a una clara reversión de los efectos del glucagón. Este cociente de 0.2 es el que se aprecia en sangre periférica tras la ingestión de una dieta balanceada. Los experimentos en que hemos usado sólo glucagón proporcionan una situación límite. Sabemos que es así, pero ello permite una amplificación del efecto que permite su estudio con una mayor precisión.

Control de la gluconeogénesis.-

Independientemente del sustrato utilizado, el aumento del flujo gluconeogénico inducido por el glucagón mostró como posibles puntos de control el segmento piruvato \rightarrow fosfoenolpiruvato y entre fructosa difosfato y fructosa-6-fosfato (Figs. 8 y 15). El aumento en la concentración de PEP es compatible con un aumento en la actividad

de pyruvato carboxilasa, fosfoenolpyruvato carboxikinasa o de ambas reacciones. El hecho de que la primera tenga lugar principalmente en la mitocondria (Scrutton y Utter 1968; Utter y Scrutton, 1969) y la segunda en el citosol (Scrutton y Utter, 1968) plantea la posibilidad de que el transporte del carbón de la mitocondria al citosol pudiera tener también importancia reguladora. En este sentido, el estudio de la distribución intracelular de metabolitos resulta de gran utilidad. Para la primera reacción el Acetyl CoA es considerado como un modulador imprescindible habiéndose llegado a establecer, como expusimos en la Sección de resultados, una clara correlación entre niveles de acetyl-CoA y flujo gluconeogénico.

En nuestro caso, el glucagón, lejos de aumentar los niveles de acetyl-CoA, produjo una disminución en los niveles de este metabolito. Como dijimos anteriormente, esto no excluye el que se haya podido producir un aumento exclusivo en el compartimiento mitocondrial o la posibilidad (Utter, 1971) de que se produjera una disminución en la concentración de algún inhibidor como, por ejemplo, podría ser acetoacetyl-CoA. Si los cálculos, sólo estimativos, de Williamson (1968) sobre la distribución intracelular de acetyl-CoA fueran correctos, parece ser que este metabolito se encontraría en la mitocondria en cantidades superiores a la constante de activación para pyruvato carboxilasa, según datos con enzima aislado. La invariabilidad de la concentración de acetyl-CoA junto con aumento

de flujo a través del enzima en presencia de glucagón, sugieren por tanto la existencia a nivel celular de otros efectos del enzima distintos de acetyl-CoA.

El efecto de glucagón disminuyendo la concentración de oxalacetato total tampoco es indicativo de un aumento de flujo a nivel de piruvato carboxilasa; no obstante, el análisis de la distribución intracelular de piruvato y oxalacetato (tabla 20 y 23) nos indican que la hormona produjo en la mitocondria, compartimento en el que se encuentra este enzima, una disminución acusada de piruvato y aumento de oxalacetato. Estos cambios son compatibles con una activación de piruvato carboxilasa.

En la siguiente etapa enzimática de no equilibrio, la formación de fosfoenolpiruvato en el citosol, se nos presenta una situación parecida a la anterior. El aumento en la concentración de PEP junto a la disminución de OAA sugieren una activación de fosfoenolpiruvato carboxikinasa pero este hallazgo no parece compatible con las propiedades del enzima derivadas de su comportamiento "in vitro". Mientras la K_m de este enzima para el oxalacetato es alrededor de $100 \mu M$ (Holten y Nordlie, 1963; Chang y col., 1966) la concentración citosólica fué sólo $\approx 7 \mu M$ descendiendo a $\approx 5 \mu M$ tras el estímulo con glucagón. En animales en ayuno, en que la producción de glucosa se halla aumentada, ha sido descrita la misma paradoja de una concentración citosólica de oxalacetato disminuida (Greenbaum y col, 1971). En el

caso del ayuno, la disminución de la concentración de substrato para esta reacción podría quizás estar compensada por el fuerte aumento en la cantidad total de enzima descrito en esta situación fisiológica (Young, 1964). Los canbios inducidos por el glucagón en nuestras condiciones experimentales, son demasiado agudos como para pensar que puedan dar lugar a variaciones de más de un orden de magnitud en la cantidad de enzima, por lo que parece más lógico el pensar que quizás el aumento de flujo en esta etapa se deba a otros mecanismos. Una alternativa sería el que el glucagón disminuyera de alguna manera la K_m del enzima para el oxalacetato, este efecto podría ser mediado por algún efector como, por ejemplo, el AMP-cíclico. La candidatura de este nucleótido cíclico como regulador se vería reforzada, en opinión de algunos autories, por su papel inductor de PEP-carboxikinasa en hígado fetal de rata (Wicks y col., 1969) y por aumentar la actividad de este enzima tras la inyección de AMP-cíclico in vivo (Wicks y col., 1969). Parece más lógico por tanto pensar que en el aumento del flujo gluconeogénético juegue un papel más importante la activación de pyruvato carboxilasa dada su posición inicial en la secuencia.

La adición de insulina al medio de perfusión, paralelamente a la disminución del flujo gluconeogénético, hizo aumentar los niveles de OAA a los valores normales en ambos compartimentos, produciendo cambios que podemos con -

siderar en reverso a los producidos por el glucagón solo. Este hecho parece sugerir que ambas hormonas actuarán a través de efectos opuestos sobre un mismo mecanismo efector. En este sentido quizás debamos indicar cómo la insulina disminuye los niveles hepáticos de AMP-cíclico (Jefferson y col., 1968).

Hemos podido ver como el glucagón produce un "crossover" en sentido opuesto al flujo entre 3-fosfoglicerato y triosa fosfato (dihidroxiacetona fosfato más gliceraldehído fosfato). Los cambios en las concentraciones de 3-fosfoglicerato y gliceroaldehído fosfato (triosa fosfato) no obstante no son reflejo fiel de cambios en la actividad y dirección del flujo metabólico. La razón para ello es que los enzimas 3-fosfoglicero-kinasa (ATP: 3-phospho-D-Glycerato 1-phosphotransferase 2.7.2.3) y gliceraldehído deshidrogenasa (D-Glyceroaldehído3-phosphate: NAD oxidoreductase (phosphorylating) 1.2.1.12) mantienen la concentración de sus reactantes próxima a su equilibrio termodinámico (Veech y col., 1970) y por tanto es necesario también considerar los cambios en la concentración de nucleótidos de adenina y nicotinamida para poder comprender el significado de los cambios de concentración de estos metabolitos. En efecto,

$$(1) \quad K_{GADK} = \frac{[NADH] \quad [1,3\text{-difosfoglycerato}]}{[NAD^+] \quad [Gliceroaldehído-P] \quad [P_i]}$$

$$(2) \quad K_{3PGK} = \frac{[ADP] [1,3\text{-difosfoglicerato}]}{[ATP] [3\text{-fosfoglicerato}]}$$

combinando las ecuaciones (1) y (2), constantes de equilibrio de 3-fosfoglicero-kinasa y gliceroaldehido deshidrogenasa, obtendremos:

$$(3) \quad \frac{[NAD^+]}{[NADH]} = \frac{1}{K} \times \frac{[3PGA]}{[GAP]} \times \frac{[ATP]}{[ADP] [P_i]}$$

Según Krebs (1971), esta relación parece indicar que el estado de reducción de los nucleótidos de nicotinamida en el citosol vendría determinado por el estado de fosforilación de los nucleótidos de adenina. Como la síntesis de un mol de glucosa requiere el consumo de al menos cuatro moles de ATP en el citosol, esto daría lugar a una disminución del cociente $[ATP] / [ADP]$ con el consiguiente aumento de P_i . El aumento P_i , que actúa como reductor, da lugar a una desviación del equilibrio de gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa (1) hacia una mayor reducción

$$(4) \quad \frac{[NAD^+]}{[NADH]} = K \times \frac{[1,3\text{-difosfoglicerato}]}{[Gliceraldehido-P] [P_i]}$$

Combinando esta ecuación con la ecuación de equilibrio de

láctico deshidrogenasa:

$$(5) \quad \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} = \frac{1}{K_{\text{LDH}}} \times \frac{[\text{Pyruvato}]}{[\text{Lactato}]}$$

obtendremos:

$$(6) \quad \frac{[\text{Lactato}]}{[\text{Pyruvato}]} = K \times \frac{[\text{Gliceraldehido-P}] [\text{P}_i]}{[\text{1,3-difosfoglicerato}]}$$

Esta ecuación pone de manifiesto como el $[\text{P}_i]$ puede incrementar el valor del cociente $[\text{Lactato}] / [\text{Pyruvato}]$.

En resumen, diremos que puesto que gliceraldehido deshidrogenasa es una reacción de equilibrio, no puede ser responsable de variaciones de flujo en la vía metabólica y que las variaciones en la concentración de sus reactantes expresan un nuevo equilibrio por lo que un crossover a nivel de los intermediarios que participan en esta reacción no puede ser valorado aisladamente, sino junto con las variaciones en las concentraciones de nucleótidos de nicotinamida y de adenina (ver ecuación (3)). En este sentido, situaciones de aumento de gluconeogénesis (glucagón) crean una nueva situación de equilibrio en la que disminuyen los cocientes $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ y $[\text{ATP}] / [\text{ADP}]$ mientras - que la disminución de la producción de glucosa (adición de insulina) da lugar al fenómeno contrario (ver tablas 5, 10, 15, 16). Estos cambios son compatibles con la dirección en las variaciones del flujo gluconeogénico. La cues --

ción de si ésta nueva situación de equilibrio podría ser consecuencia sólo del aumento de P_i en el citosol carece de soporte experimental debido a la imposibilidad actual de medir la distribución intracelular de este compuesto.

En nuestra opinión quizás sea demasiado simplista el interpretar los cambios en el estado de reducción como secundarios al aumento de $[P_i]$ y consideramos que quizás el factor más importante sea el aumento en la generación de NADH debido a un aumento en la oxidación de ácidos grasos. Ya hemos señalado anteriormente que la oxidación de sustrato no podía dar cuenta de los requerimientos energéticos para la síntesis de glucosa, de ahí que se apunta ra a los ácidos grasos como posible fuente de endógena de energía. La cantidad de ácidos grasos libres del tejido hepático es muy baja. Nuestras mediciones (Dole, 1960) en hígados de ratas ayunadas nos dieron valores 0.75 nEq/g - tejido húmedo. Considerando que la oxidación completa de una molécula de ácido palmítico puede dar lugar a 130 de ATP y que cada molécula de glucosa requiere seis enlaces fosfato, hemos calculado si el "pool" de ácidos grasos endógenos podrían dar cuenta de la energía necesaria durante el estímulo de gluconeogénesis inducido por el glucagón. De acuerdo a estos cálculos, en el caso de la alanina (tabla 6) en que se produce un incremento en la producción de glucosa de $29 \text{ } \mu\text{moles/100 g P.C./Hr.}$, los ácidos grasos libres no podrían proveer de energía para sintetizar glucosa

por más de siete segundos. Esto sugiere que necesariamente debe haber habido un aumento en la actividad lipolítica del tejido para así poder mantener la constancia o incluso incrementar el "pool" de ácidos grasos libres susceptibles de oxidación. El estímulo del glucagón va, pues, paralelo a un aumento de la actividad lipolítica que explicaría el aumento del estado de reducción y la fuente de energía necesaria para explicar los balances negativos.

El "crossover" entre fructosa-difosfato y fructosa-6-fosfato tras el estímulo con glucagón, teóricamente, podría ser debido a un aumento en la actividad de fructosa-difosfatasa, inhibición de fosfofructokinasa o quizás el resultado de una sumación de ambos efectos. Los cambios observados en la concentración de intermediarios no son favorables para interpretar este "crossover" como debido a una inhibición de fosfofructokinasa. Este enzima es inhibido por ATP y citrato, aunque en hígado de rata la inhibición por ATP no parece ser muy significativa (Passonneau y Lowry 1964).. El efecto del glucagón disminuyendo el cociente $\frac{[ATP]}{[ADP]}$ y la concentración citosólico de citrato son contrarios a una inhibición de fosfofructokinasa. Por otra parte sabemos que la elevación de fructosa-6-fosfato actuaría elevando la K_i de citrato para fosfofructokinasa (Passonneau y Lowry, 1964); lo cual, una vez más, resulta ser sumamente desfavorable para pensar en una inhibición de este enzima. En vista de estos hechos parece razonable concluir

que este "crossover" sea consecuencia de una activación de fructosa-difosfatasa. La actividad de este enzima, no obstante, no parece ser causa del aumento del flujo gluconeogénico que produce el glucagón dado que esta hormona no parece tener efecto cuando se usa fructosa como sustrato. La elevación de las concentraciones de fructosa-6-fosfato y de glucosa-6-fosfato, son consecuencia de la elevación de glucosa ya que ésta activa la formación de glucosa-6-fosfato y este intermediario y fructosa-6-fosfato se encuentran en equilibrio por medio de una potente isomerasa. Es interesante observar cómo estas predicciones se cumplen ya que en nuestros experimentos ha habido un paralelismo estricto entre flujo gluconeogénico y concentración de estos intermediarios.

Papel regulador del transporte de aniones.-

Dado que la membrana mitocondrial es prácticamente impermeable a NADH la célula posee otros mecanismos para transportar este nucleótido de o hacia el citosol. En situaciones en que predomina la actividad glicolítica el NADH debe ser transportado hacia la mitocondria para allí ser reoxidado en la cadena respiratoria; cuando la oxidación de ácidos grasos genera NADH en la mitocondria parte debe ser transportado al citosol en donde será utilizado para procesos de síntesis. La impermeabilidad de la membrana mitocondrial hace que el NADH sea transportado como forma reducida de metabolitos ligados a deshidrogenasas dependien

tes del sistema $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$, como, por ejemplo, malato. El malato no es que pase libremente la membrana sino que es transportado. Han sido descritos hasta siete sistemas distintos de transportes de aniones en la mitocondria (Chappell, 1969). Existen dos tipos de transportadores aquellos que catalizan el intercambio entre un anión y un grupo hidroxilo y aquellos otros que catalizan el intercambio anión-anión.

La síntesis de glucosa requiere NADH para la reducción de 1,3 difosfoglicerato en el citosol. Esto quiere decir que dependiendo del grado de reducción del sustrato respecto a la glucosa se requerirá o no el transporte de NADH de la mitocondria al citosol. Sustratos más reducidos que la glucosa, como el lactato, producen NADH en el citosol al formar piruvato con lo que el OAA formado en la mitocondria se transaminaría para formar aspartato, cruzar la mitocondria y regenerar OAA en el citosol por una nueva transaminación. Este esquema fue propuesto por Lardy y col., (1965). Sustratos más oxidados que la glucosa como piruvato deben de transportar NADH de la mitocondria al citosol por lo que Krebs y col. (1967) propusieron que el malato sería el transportador de carbón y equivalentes de reducción hacia el citosol. Estas ideas fueron corroboradas experimentalmente mediante el uso de inhibidores metabólicos (Anderson y col., 1971; Parrilla y col., 1973). En la figura 21 podemos seguir esquemáticamente el curso del car

bón para la síntesis de glucosa a partir de lactato, El , esquema propone la salida de aspartato y α -Ketoglutarato y la entrada de malato y glutamato para mantener un balance de cargas.

La gluconeogénesis a partir de alanina, teórica - mente, debería comportarse como en el caso de pyruvato; pe ro, como se indica en la figura 22 la participación de aspa rtato en la síntesis de urea puede generar NADH en el - citosol. La transformación de arginina-succinato en argini na libera fumarato que puede pasar a formar malato que asimismo puede ser oxidado para formar OAA y NADH. Esto implica que parte de los requerimientos de NADH para la - reducción de 1,3 difosfoglicerato pueden ser satisfechos por esta vía, por lo que sólo parte del carbón debería - ser transportado como malato. En este sentido la alanina ocuparía un lugar intermedio entre lactato y pyruvato.

Las tablas 19 - 24 nos muestran que la distribu - ción intracelular c alculada de metabolitos es compatible con el flujo de carbón a través de la mitocondria que aca bamos de postular para cada substrato. En el caso del - lactato la concentración del malato citosólico es casi el doble que con alanina y el gradiente mitocondria: citosol es de 0.78 en el caso de lactato y de 1.91 con alanina lo que favorece el paso hacia la mitocondria en el caso de la alanina. La casi invariabilidad de la concentración de - glutamato con los distintos substratos hace pensar que es

te metabolito actúa como a modo de catalizador. La disminución de α -Ketoglutarato y aumento de aspartato en el citosol de los hígados perfundidos con alanina no es más que un reflejo del equilibrio en que se encuentran las transaminasas por el cual se debería producir un consumo de cetoácidos y aumento en la concentración en equilibrio de aspartato. Estas observaciones iniciales en los grupos de control indican que la distribución de metabolitos, de acuerdo con nuestros cálculos, arroja valores absolutamente predictibles de acuerdo a los conocimientos que hoy se tiene sobre el metabolismo de estos substratos lo que apoya la fiabilidad del procedimiento.

Hechas estas consideraciones previas pasaremos a analizar los efectos del glucagón sobre la distribución intracelular de intermediarios. Con los dos substratos utilizados la fenomenología ha sido muy similar: la presencia de glucagón produjo un aumento en la concentración intramitocondrial de casi todos los intermediarios lo que unido a su disminución en el citosol dio lugar a un aumento en el gradiente mitocondria: citosol en casi todos los casos. El problema queda planteado en términos de averiguar si existe alguna etapa común a los dos substratos que nos pudiera explicar el aumento en el transporte de aspartato cuando el lactato es el substrato gluconeogénico y de malato en el caso de L-Alanina.

El análisis de los datos nos lleva a pensar que es

te lazo común para los dos substratos lo constituye el aumento de transporte de glutamato al interior de la mitocondria que da lugar a aumentos en el gradiente mitocondria: citosol de veinte a cuarenta veces. Analizaremos aisladamente para cada substrato las consecuencias en el aumento intramitocondrial de glutamato: En el caso del lactato - Fig. 21 la elevación de los niveles de glutamato trae como consecuencia un aumento de aspartato para mantener el equilibrio. El aumento de α -KG es, con toda probabilidad, consecuencia de la elevación de la concentración en equilibrio de oxalacetato debida a una mayor carboxilación de piruvato y mantenida por la elevación de malato. Estos cambios producen un aumento de diez veces en el gradiente mitocondria: citosol de aspartato lo que creemos que sugiere que la etapa de transporte de este anión puede ser limitante y que el aumento del gradiente es necesario para activar el transporte de todo el oxalacetato formado. La pregunta que parece obvia es la de por qué con una elevación de diez veces en el gradiente de malato este no sale al exterior? La elevación en la concentración de malato creemos que es una consecuencia de la salida de α -KG (Fig. 21) Para que el malato pudiera salir al citosol tiene que ser intercambiándose con α -KG (Chapell, 1968) y el aumento de diez veces en el gradiente de este último hace este intercambio muy desfavorable. Malato también podría intercambiarse con fosfato; pero, aparentemente, la capacidad de

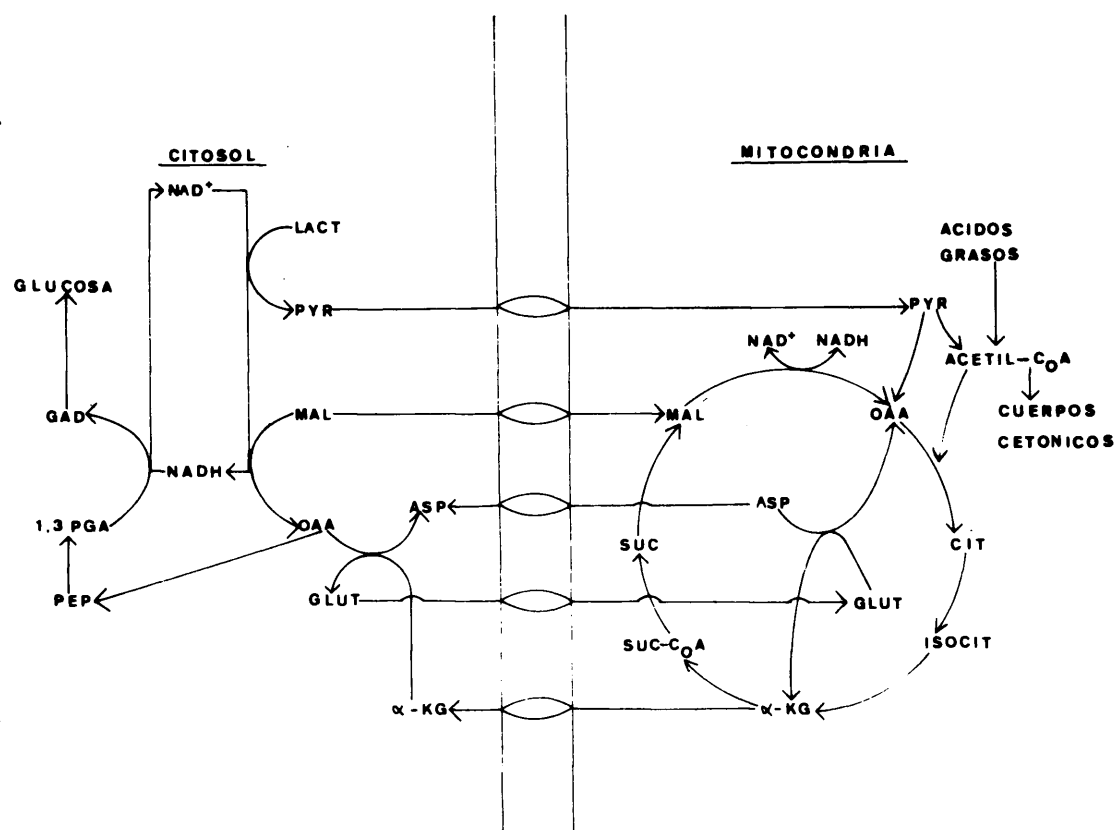


Fig. 21. - Representación esquemática de la ruta metabólica de L-Lactato para la formación de glucosa. Dado que la oxidación de lactato en el citosol genera NADH, se postula la salida de OAA mitocondrial en forma de aspartato.

este carrier es inferior a la del intercambio de malato - α -Ketoglutarato.

Pasemos a continuación a analizar el caso de la alanina (Fig. 22). La gluconeogénesis a partir de aminoácidos lleva implícita la síntesis simultánea de urea gracias a la cual se impiden los efectos tóxicos del amoníaco libre. De cada molécula de urea uno de sus átomos de nitrógeno viene de amonio libre a través de la formación de carbamyl-fosfato y citrulina y otro átomo de nitrógeno de la síntesis de arginino-succinato a partir de aspartato. En la Fig. 22 se localizan topográficamente estas reacciones. La única reacción que puede deaminar aminoácidos con actividad suficiente es glutamato deshidrogenasa (Brauns - tein, 1957) cuya localización es exclusivamente mitocondrial. Esto indica que, en el caso que ahora nos ocupa, el aumento intramitocondrial de glutamato facilitaría su deaminación con el consiguiente aumento de α -Ketoglutarato que saliendo al citosol sería de nuevo utilizado para transaminar alanina y forma pyruvato. Estas reacciones - $(\text{glutamato} \rightarrow \alpha\text{-Ketoglutarato})_m \rightarrow (\alpha\text{-Ketoglutarato} \rightarrow \text{Glutamato})_c$ tienen carácter cíclico y la aceleración de este proceso trae como consecuencia la mayor deaminación de alanina. El efecto del glucagón aumentando la concentración de glutamato favorece este proceso puesto que da lugar a un aumento de casi cinco veces en el gradiente mitocondria : citosol de α -Ketoglutarato. Por otra parte, el

glucagón produjo un aumento en la concentración intracelular de alanina, quizás activando su transporte, lo que resulta en un aumento en la concentración en equilibrio de aspartato citosólico y sabemos que éste inhibe el transporte de α -Ketoglutarato hacia el interior de la mitocondria (Mc Givan y col., 1969). Como hemos dicho anteriormente la deaminación de aspartato durante la síntesis de urea - proporciona carbón y equivalentes de reducción para parte de la síntesis de glucosa por lo que el resto creemos debe ser provisto como malato mitocondrial (Fig. 22). En este sentido el efecto del glucagón aumentando este gradiente - nuevamente favorecería el proceso de su transporte al citosol. El malato en este caso no sería intercambiado con α -Ketoglutarato, como hemos visto parece suceder en el caso del lactato como substrato, sino con fosfato o con citrato (Chapell, 1968). En este sentido debemos resaltar que simultáneamente se produjo un transporte neto de citrato a la mitocondria (tablas 22 y 23). Dentro de este esquema lo más probable es pensar que glutamato y α -Ketoglutarato neutralicen mutuamente sus cargas mientras que la diferencia entre la entrada de piruvato (monocarboxílico) y la salida de malato (dicarboxílico) puede ser compensada con entrada de aspartato.

Hemos visto como el incremento de gluconeogénesis producido por glucagón da lugar a un aumento en el gradiente mitocondria: citosol de aquellos metabolitos que actúan

como carriers de carbón para la síntesis de fosfoenolpyruvato en el citosol. La significación reguladora de este hallazgo viene dada por el hecho de que la concentración in vivo (o tejido intacto) de algunos de los intermedios citados (malato, α -Ketoglutarato, etc.) está por debajo de 1 mM, concentración que es considerablemente inferior a las necesarias con mitocondria aislada para conseguir velocidades máximas de transporte.

La insulina produjo en toda situación una reversión de los efectos del glucagón sin mostrar en ningún caso cambios suficientemente significativos respecto al control. Este hecho lo interpretamos como que ambas hormonas actúan sobre un efecto común en una etapa muy precoz del que posiblemente dependen todos los demás efectos observados.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.-

Hemos visto como la formación de glucosa requiere la salida de α -Ketoglutarato de la mitocondria. Esta salida de α -Ketoglutarato, de acuerdo con experimentos realizados con mitocondria aislada, se ve favorecida por un aumento de malato citosólico o por su aumento dentro de la mitocondria (Lanove y Williamson, 1971). Estos hechos sugieren que debe haber una acción coordinada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para mantener adecuados niveles de α -Ketoglutarato. Es obvio, por ejemplo, que un aumen-

to de actividad de α -Ketoglutarato deshidrogenasa actuaría disminuyendo los niveles de α -Ketoglutarato lo que puede dar lugar a profundos cambios en la utilización de glutamato y la movilidad de malato y aspartato hacia el citosol. Los cambios que hemos descrito durante la estimulación de gluconeogénesis por glucagón, son compatibles con una disminución del flujo a través del ciclo, lo que a través de una elevación de los reactantes de aspartato aminotransferasa y de malato, favorece considerablemente el transporte de carbón hacia el citosol. ¿Sobre qué punto y cómo se ejercería el control? Las reacciones susceptibles de regulación son piruvato deshidrogenasa (Pyruvate: lipoate oxidoreductase (acceptor-acetylating) 1. 2.4.1.), citrato sintetasa, isocitrato deshidrogenasa y α -Ketoglutarato deshidrogenasa. Todas estas etapas tienen en común el ser susceptibles a regulación por $[NAD^+]$ / $[NADH]$; la disminución de este cociente, es decir el aumento de $[NADH]$, tiene directa e indirectamente efectos inhibidores sobre todas estas reacciones enzimáticas. La activación de gluconeogénesis se ha descrito que conlleva una disminución en la oxidación de piruvato (Friedman y Graaff, 1958; Koeppe y col., 1959). In vivo, la activación de gluconeogénesis da lugar a disminución de piruvato y aumento de acetyl CoA lo que originalmente indujo a pensar en una posible activación de piruvato deshidrogenasa. En nuestro caso sólo vemos la disminución de

pyruvato que creemos debe ser interpretada como causa del aumento en la formación de oxalacetato y al aumento en el estado de reducción. En nuestro caso el aumento en el cociente $[\text{acetyl-CoA}] / [\text{CoA}]$ (Garland y Randle, 1964) y la mayor reducción de la pareja $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ (Garland 1964) son factores que apoyan una disminución de flujo a través de pyruvato deshidrogenasa. Por otro lado, el incremento en $[\text{NADH}]$ cabe esperar de lugar a un aumento intramitocondrial de $[\text{ATP}] / [\text{ADP}]$ (Chance y Maitra, 1963) lo que tendría importantes efectos reguladores. En el caso de pyruvato deshidrogenasa, por ejemplo, sabemos que el ATP tiene efectos inhibidores (Linn y col., 1969).

El estado de reducción de la pareja $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ sería también a juicio de La Noué y Williamson (1971) el principal regulador del flujo a través de citrato sintetasa debido a su efecto sobre las disponibilidades de oxalacetato. Los niveles de oxalacetato también vienen determinados por la concentración de malato. En nuestro caso el estímulo gluconeogénico del glucagón ha ido asociado a aumento intramitocondrial de malato, oxalacetato y citrato, lo que no es compatible con un efecto de NADH disminuyendo el flujo a través de citrato sintetasa.

Isocitrato deshidrogenasa es activada por ADP e inhibida por NADH pareciendo ser el control por este último el realmente importante (Goebell y Klingenberg, 1964; La Noué y col., 1970). Finalmente, α -ketoglutarato deshide

drogenasa está sometida a un tipo de control muy similar al de piruvato deshidrogenasa, es decir aumento en los cocientes $[GTP] / [GDP]$ y $[NADH] / [NAD^+]$ son inhibidores. Ambos hechos están interrelacionados dado que, como hemos indicado, un aumento de NADH debería dar lugar a un aumento en $[ATP] / [ADP]$ que, a consecuencia del equilibrio en las reacciones de transfosforilación, equivale a un aumento en $[GTP] / [GDP]$. Los cambios descritos durante el estímulo - gluconeogénico inducido por el glucagón sugieren por tanto efectos inhibidores sobre piruvato deshidrogenasa y α -Keto glutarato deshidrogenasa. Estos cambios, posiblemente mediados por variaciones en el cociente $[NAD^+] / [NADH]$ cooperarían a mantener niveles intramitocondriales altos de α -Ketoglutarato, intermediario clave para favorecer la aceleración en la traslocación de aniones que dará como resultado un aumento de gluconeogénesis. El incremento en la oxidación de ácidos grasos fuera del ciclo de Krebs proveería a la cadena respiratoria del NADH necesario para subvenir el incremento en las demandas de ATP.

Consideraciones en torno al mecanismo de acción del glucagón.-

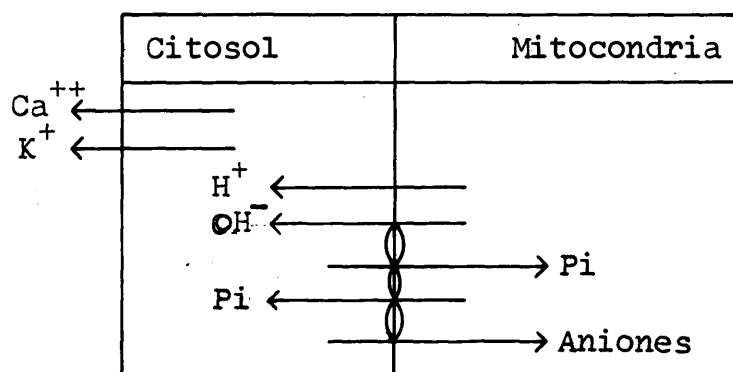
Hay dos preguntas que parecen obvias respecto al mecanismo de acción del glucagón: la primera es cuál es el mediador de su acción y la segunda es si existe un mecanismo

unitario que pudiera explicar todos los efectos que hemos observado. Respecto al primer punto Exton y Park han sido los primeros en proponer al AMP-cíclico. A través de un gran número de publicaciones, muchas de las cuales hemos citado a lo largo de este trabajo, han podido establecer una clara correlación entre efectos de glucagón y niveles de AMP-cíclico. Estos autores ya anticiparon que quizás sea demasiado simplista adscribir todos los efectos de la hormona a las variaciones en la concentración de este nucleótido cíclico. Los hechos sugieren, pero no prueban, una relación causa efecto. En este sentido tiene interés el que en animales adrenalectomizados el glucagón no estimule gluconeogénesis a pesar de producir un acusado aumento en los niveles de AMP-cíclico. (Friedman y col. 1967; Exton y col., 1970). También consideramos de gran interés el que se estudiara si el glucagón aumenta los niveles de AMP-cíclico en aquellas especies en que no estimula gluconeogénesis.

Independientemente de si el AMP-cíclico es o no un mediador obligado tiene gran interés saber si existe una reacción, una etapa, cuya activación pudiera tener como consecuencia toda la cadena de cambios moleculares que hemos descrito. De tomar partido por un mecanismo de tal naturaleza nos inclinaríamos por una activación de lipolisis. Los ácidos grasos se oxidan intramitocondrialmente en forma directamente proporcional a la oferta; por tanto,

una mayor movilización de 'ácidos grasos puede dar lugar a un aumento en la generación de NADH con desplazamiento del cociente $[NAD^+] / [NADH]$ hacia una mayor reducción. Estos cambios explicarían una activación de piruvato carboxilasa e inhibición de algunas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que crearían el "ambiente" adecuado para facilitar una aceleración en el paso de oxalacetato al citosol.

A pesar de nuestro intento de unificación quedan algunos cabos sueltos, por ejemplo, ¿cómo explicamos el sentido del aumento en la salida de K^+ intracelular? o ¿cómo aclarar la aparente aceleración en la entrada de glutamato al interior de la mitocondria?. Respecto a estas últimas preguntas debemos decir que quizás estén relacionadas entre si. El glucagón también se ha descrito que aumenta la excreción de Ca^{++} (Friedman y Park, 1968) y la salida de estos cationes podría dar lugar a una mayor salida de protones del interior de la mitocondria junto con hidroxilos para mantener el pH, lo que por medio del "carrier" de fosfato podría dar lugar a una entrada de aniones carboxílicos al interior de la mitocondria.



Vemos, pues, que actualmente resulta difícil dar una explicación unitaria a todos los fenómenos aunque sí creemos poder dar cuenta de gran número de ellos a través de activación de etapas relativamente simples como la activación de lipólisis. Un mejor conocimiento de la cinética del transporte de intermediarios a través de la membrana mitocondrial será de gran ayuda para comprender mejor el mecanismo de acción de la hormona.

CONCLUSIONES

=====

CONCLUSIONES

1º.- El hígado de rata aislado y perfundido con un sistema sin células rojas, demostró poseer cualidades funcionales adecuadas para su empleo como modelo experimental en el estudio de la regulación de la síntesis de glucosa.

2º.- El glucagón produjo un estímulo de las actividades gluconeogénica y ureogénica en hígados perfundidos con L-Lactato o con L-Alanina como substratos. En ambos casos el incremento de estas funciones corrió paralelo con una mayor utilización de substrato arrojando cocientes subtrato utilizado: glucosa producida de alrededor de 2.3.

3º.- Mediante la medición de las concentraciones - en equilibrio de los intermediarios de la vía gluconeogénica se pudo apreciar que el estímulo gluconeogénico del glucagón da lugar a "crossovers" en la dirección de síntesis de glucosa entre oxalacetato y fosfoenolpyruvato y entre fructosa-difosfato y fructosa-6-fosfato. Este patrón de intermediarios es compatible con un aumento de actividad de PEP-carboxikinasa en el primer caso y estimulación de fructosa difosfatasa y/o inhibición de fosfofructokinasa en el segundo.

4º.- El estudio de la distribución intracelular de metabolitos dió patrones compatibles con los conocimientos

actuales sobre el metabolismo de los substratos empleados. La estimulación con glucagón produjo cambios en la distribución intracelular de metabolitos caracterizado por un descenso general de su concentración en citosol y aumento en mitocondria. Esta redistribución dió lugar a que en la mitocondria se produjera un descenso de piruvato y aumento de oxalacetato por encima de los niveles del control. Este "crossover" indica una activación de piruvato carboxilasa que es la primera reacción de no equilibrio en la síntesis de glucosa y que tiene lugar exclusivamente en el compartimento mitocondrial.

5º.- La elevación intramitocondrial de intermediarios dio lugar al aumento de gradiente mitondria: citosol de malato y aspartato que son los portadores de carbón hacia el citosol para la síntesis de fosfoenolpiruvato. Estos cambios se interpretan como los más óptimos para conseguir una aceleración del flujo gluconeogénico.

6º.- La cantidad de substrato disponible para su oxidación no es suficiente para satisfacer las demandas energéticas para la síntesis de glucosa. Este hecho, unido a que los cambios en la concentración de intermediarios y estado de reducción de nucleótidos de nicotinamida sugieren una disminución en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, parecen indicar que el estímulo de gluconeogénesis lleva implícito un aumento de lipólisis.

La comprobación directa de las limitadas dimensiones del "pool" de ácidos grasos libres apoya esta hipótesis. El aumento de oxidación de ácidos grasos, explicaría el aumento en el estado de reducción y la activación de piruvato carboxilasa.

7º.- La insulina, con proporciones molares de glucagón/insulina de 0.2, revierte prácticamente todos los efectos del glucagón. El hecho de que los patrones de concentración y distribución de intermediarios vuelvan a los valores del control sugiere que ambas hormonas actúan antagónicamente sobre un efecto común.

8º.- La salida de cationes mediada por el glucagón podría ser un mecanismo cooperador en la referida redistribución de aniones a través de la membrana mitocondrial.

B I B L I O G R A F I A
=====

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR-PARADA, E., EISENTRAUT, A.M. y UNGER, R.H., (1969) Diabetes 18, 117-123.
- ANDERSON, J.H., NICKLAS, W.J., BLANK, B., REFINO, C. y WILLIAMSON, J.R., (1971). En "Regulation of gluconeogenesis" (eds. Söling, H.D. y Willms, B). Academic Press, New York, pp.293-313.
- ANDRES, R., BALTZAN, M.A., CADER, G. y ZIERLER, K.L., -- (1962) J. Clin. Invest. 41, 108-115.
- ASSAN, R., ROSSELIN, G. y DOLAIS, J. (1967) J. Ann. Diabetol. Hotel Dieu 7, 25
- AYUSO-PARRILLA, M.S. y PARRILLA, R. (1973) Biochim. Biophys. Res. Comm., 52, 582-587.
- BEALE, R.N. y CROFT, D.J. (1961) J. Clin. Path., 14, 418-424.
- BENGMARK, S., HAFSTRÖM, L.O. y LOUGHRIDGE, B. (1969) Acta Hepato-Splenológica, 16, 349.
- BERGMEYER, H.V. (Ed.) (1965). En "Methods of Enzymatic Analysis". Academic Press. New York.
- BERNARD, C. (1855) Compte Rendu. Acad. Sciences, 41, 461.
- BERNT, E. y BERGMEYER, H.V. (1963). En "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. Bergmeyer, H.V.). Academic -- Press. New York, pp.384-388.
- BERRY, M.N. y FRIEND, D.S. (1969) J. Cell. Biol. 43, 506 - 520.

- BISHOP, J.S. y LARNER, J. (1967) J. Biol. Chem., 242, -
1354-1356.
- BLAIR, J.B., COOK, D.E. y LARDY, H.A. (1973) J. Biol.
Chem., 248, 3601-3607.
- BÖTTGER, I., FALOONA, G.R. y UNGER, R.H., (1971) Diabe-
tes, 20 (suppl. 1) 338.
- BRAUER, R.W., PESOTTI, R.L. y PIZZOLATO, P. (1951) Proc.
Soc. Exptl. Biol. Med., 78, 174-181
- BRAUNSTEIN, A.E. (1957) Advan. Enzymol. Telat. Areas Mol.
Biol., 19, 335-389.
- BROMER, W.W., SINN, L.G., STAUB, A. y BEHRENS, O.K., -
(1956) J. Am. Chem. Soc., 78, 3858-3860.
- BUCHANAN, K.D., VANCE, J.E., DINSTL, K. y WILLIAMS, R.H.
(1969) Diabetes, 18, 11-18.
- BÜCHER, T. (1970). En "Pyridine-Nucleotide-Dependent Dehy-
drogenases" (ed. Sund, H.), Springer-Verlag, Berlín,
pp.439-461.
- BÜCHER, TH. y RÜSSMANN, W. (1964) Angew. Chem., Int. Ed. -
Engl., 3, 426-439.
- BUTCHER, R.W., HO, R.J., MENG, H.C. y SUTHERLAND, E.W.
(1965) J. Biol. Chem., 240, 4515-4523.
- CAHILL, G.F., Jr. (1970) New Engl. J. of Med., 282, 668-675.
- COLLIP, J.B. (1923) Am. J. Physiol., 63, 391.
- COREY, E.L. y BRITTON, S.W. (1941) Am. J. Physiol., 131, -
783.
- CHANCE, B., HOLMES, W., HIGGINS, J.J., y CONNELLY, C.M.

- (1958) Nature (London) 182, 190.
- CHANCE, B. y MAITRA, P.K. En "Control Mechanisms in Respiration and Fermentation" (Ed. Wright, B.) Ronald Press, New York, p.p.307-332.
- CHANCE, B. y WILLIAMS, G.R. (1956) Advan. Enzymol., 17, 65-134.
- CHANCE, B., WILLIAMS, G.R., HOLMES, W.F., y HIGGINS, J., (1955) J. Biol. Chem., 217, 439-451.
- CHANG, H.C., MARUYAMA, H., MILLER, R.S. , y LANE, D.D., (1966) J. Biol. Chem., 241, 2421-2430.
- CHAPPELL, J.B. (1968) Brit. Med. Bull., 24, 150-157.
- CHAPPELL, J.B. (1969) En "Inhibitors tools in cell Research" (eds. Bücher y Sies H.) Springer-Verlag, New York, pp. 335-350.
- DOLE, V.P. y MEINERTZ, H. (1960) J. Biol. Chem., 235, - 2595-2599.
- EGGLESTON, L.V. y HEMS, R. (1952) Biochem. J., 52, 156-160
- EISENSTEIN, A.B. y STACK, I. (1968) Endocrinology, 83, 1337-1348.
- EUPIN, E. y VERZAR, F. (1950) Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 8, 627.
- EXTON, J.H., JEFFERSON, L.S., BUTCHER, K.W. y PARK, C.R. (1966) Am. J. Med. 40, 709-715.
- EXTON, J.H., MALETTE, L.E., JEFFERSON, L.S., WONG, E.H.A., FRIEDMANN, N., MILLER, T.B. Jr. y PARK, C.R. (1970) Recent Progress in Hormone Research, 24, 411-456.

- EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 1424-1433.
- EZRIN, C., SALTER, J.M., OGRYZLO, M.A., y BEST, C.H., (1958) Canad. Med. Ass. J., 78, 96-98.
- FEARON, W.R. (1939) Biochem. J. 33, 902
- FOA, P.P., SANTAMARIA, L., BERGER, S., SMITH, J.A. y WEINSTEIN, H.R. (1952) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 80, 635.
- FRIEDMAN, A.D. y GRAAF, S. (1958) J. Biol. Chem., 233, 292-295.
- FRIEDMANN, N., EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1967) Biochem. - Biophys. Res. Commun., 29, 113-119.
- FRIEDMAN, N. y PARK, C.R. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. -- U.S.A. 61, 504-508.
- GARCIA, A., WILLIAMSON, J.R. y CAHILL, G.F., Jr. (1966) - Diabetes 15, 188-193
- GARLAND, P.B. (1964) Biochem. J., 92, 10c-12c.
- GARLAND, P.B. y RANDLE, P.J. (1964) Biochem. J. 91, 6c-7c.
- GOEBELL, H. y KLINGENBERG, M. (1964) Biochem. Z 340, 441 - 464.
- GOODMAN, M.N., PARRILLA, R., TOEWS, N. (1973) Amer. J. Physiol. 25, 1384-1388.
- GOODRIDGE, A.G. y BALL, E.G. (1965) Comp. Biochem. Physiol. 16, 367-381.
- GREY, N., MC. GUIGAN, J.E., y KIPNIS, D.M. (1970) Endocrinology 86, 1383-1388.
- GROEN, J., WILLEBRANDS, A.F., KAMMINGA, C.E., SCHOTHORST,

- H.K. y GODFRIED, E. G. (1951) Aeta Med. Scand., 141, 352.
- HARROP, G.A., y BENEDICT, E.M. (1923) Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 20, 430.
- HOFFMAN, W.S. (1937) J. Biol. Chem. 120, 51.
- HOHORST, H.J. (1963) En "Methods of Enzymatic Analysis" - (ed. Beymeyer, H.V.) Academic Press, New York, pp. 266-270.
- HOLMES, W.F. (1959) Trans. Faraday Soc., 55, 1122-1126.
- HOLTEN, D.D., y NORDLIE, R.L. (1963) Biochemistry, 4, 723-731.
- HOLZER, H., SHULTZ, G. y LYNEN, F. (1956) Biochem. Z 328, 252-263.
- IZZO, J.L., RONCONE, A y PALIANI, M.A. (1957) Fed. Proc. 16, 200.
- JACOBJ, C. (1890) Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., 26, 388.
- JEFFERSON, L.S., EXTON, J.H., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., y PARK, L.R. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1031-1038.
- JIMENEZ, M.I., CARBALLO, B., AYUSO-PARRILLA, M.S. y PARRILLA, R. (1974) Biochim. Biophys. Acta. (en prensa).
- KEECH, D.B. y UTTER, M.F. (1963) J. Biol. Chem. 238, 2609-2514.
- KESTENS, P.J. (1964) "La perfusión du Foie Isolé", Editions Arscia S.A. Bruselas.
- KIMBALL, C.P. y MURLIN, J.R. (1923) J. Biol. Chem., 58,

337-346.

- KLINGENBERG, M. y PFAFF, E. (1966) En "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (eds. TAGER, J.M., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E. y SLATER, E.C.) BBA Library, Vol. 7, Elsevier, Amsterdam, pp. 180.
- KOEPPE, R.E., MOORKIDES, L.A., y MILL, R.J. J. Biol. Chem. 234, 2219-2222.
- KREBS, H.A. (1953) Biochem. J. 54, 82-86.
- KREBS, H.A. (1971) En "Regulation of gluconeogenesis" (eds. SÖLING, H.D. y WILLMS, B.) Academic Press, New York, pp. 114-117.
- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K. (1932) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. chem. 210, 33-66.
- KREBS, H.A. y VEECH, R.L. (1969) En "The Energy level and Metabolic Control in the Mitochondria" (eds. PAPA, S., TAGER, J.M., QUAGLIARELLO, E. y SLATER, E.C.) Adriatica Editrice, Bari, pp. 329-340.
- KUMON, A., YAMAMURA, H. y NISHIZUKA, Y. (1970) Biochem. - Biophys. - Res. Commun. 41, 1290-1297.
- LA NOUË, K., NICKLAS, W.I. y WILLIAMSON, J.R. J. Biol. Chem. 245, 102-111.
- LA NOUË, K.F. y WILLIAMSON, J.R. (1971) Metabolism. 20, - 119-140.
- LANGAN, T.A. (1968) Science 162, 579-580.
- LANGSLOW, D.R. y HALES, C.N. (1970) Laucet i, 1151-1152.
- LARDY, H.A., PAETKAN, V. y WALTER (1965) Proc. Nat. Acad.

Sci, U.S.A. 53, 1410-1415.

- LARNER, J. y VILLAR-PALASI, C. (1971) En "Current topics in Cellular Regulation" (eds. Horecker, B y Stadtman, E.) Vol. 3, Academic Press. New York.
- LEFEBVRE, P. (1966) En "Contribution a l'etude du rôle physiologique du glucagon" (ed. Arscia), Bruselas.
- LEWIS, S.B., EXTON, S.H., HO, R.J., y PARK, C.R. (1971) Citado en "The glucagon" (eds. Lefebvre, P.J. y Unger, R.H.) Pergamon Press, pp. 101.
- LINN, T.C., PETTIT, F.H., HUCHO, F. y REED, L.J., (1969) En "Current topics in cellular respiration" (eds. Honcker, B.L. y Stadiman, E.R.) Academic Press. - New York, p.243.
- LONDON, D.R., FOLEY, T.H., y WEBB, C.G., (1965) Nature, - 208. 588-589.
- LOWRY, O.H. y PASSONNEAU, J.V. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2268.
- LUNDGAARD, E., NIELSEN, N.A., y ORSKOV, S.L. (1939) -- Scand. Arch. Physiol. 81, 11-19.
- MACKRELL, D.J. y SOKAL, J.G.T. (1970) Biochem. 5, 120, - 187-193.
- MALLETTE, L.E., EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1969a) J. Biol. Chem. 244, 5713-5723.
- MALLETTE, L.E., EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1969 b) J. Biol. Chem. 244, 5724-5728.
- MARCO, J., CALLE, C., ROMAN, D., DIAZ FIERROS, M., VILLA-

- NUEVA, M.L. y VALVERDE, I. (1973). New Engl. J. Med. 288, 128/31.
- MAYER, D.H., WILLIAMSON, J.R. y LEGALLAIS, V., (1969) Chemical Instrumentation 1, 383-389.
- MC. GIVAN, J.B., BRADFORD, N.M., y CHAPPELL, J.B. (1969) FEBS Lett. 4, 247-250.
- MENAHAN, L.A., ROSS, B.D., y WIELAND, O. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 38-44.
- MILLER, L.L. (1960) Nature 185, 248.
- MILLER, L.L., BLY, C.B., WATSON, M.L. y BALE, W.F. (1951) J. Exptl. Med. 94, 431.
- MÜLLER, W.A., FALOONA, G.R., AGUILAR -PARADA, E. y UNGER, R.H. (1970) New Engl. J. Med. 283, 109-115.
- MÜLLER, W.A., FALOONA, G.R. y UNGER, R.H. (1971) New Engl. J. Med. 285, 1450-1454.
- MURLIN, J.R., GLOUGH, H.D., GIBBS, C.B.F. y STORES, A.M., (1923) J. Biol. Chem. 56, 253-296.
- NEWSHOLME, E.A. y GEVERS, W. (1967) Vitamins and Hormones, 25, 1.
- OHNEDA, A., AGUILAR-PARADA, E., EISENTRAUT, A.M. y UNGER, R.H. (1969) Diabetes 18, 1-10.
- OEWN, O.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J. y CAHILL; G.F. Jr. (1969) J. Clin. Invest. 48, 574-583.
- PARRILLA, R. y GOODMAN. M.N. (1974) Biochem. J., 138, 341-348.
- PARRILLA, R., GOODMAN, M.N., TOEWS, N. (1974) Diabetes 23

(En Prensa)

PARRILLA, R., LINDROS, K.O., OSHINO, N., y WILLIAMSON, J.R.
(1973) IX International congress of Biochemistry,
Suecia, Abstract Book p.369.

PARRILLA, R., OHKAWA, K., LINDROS, K.O., ZIMMERMAN, V.P.,
KOBAYASHI y WILLIAMSON, J.R. (1974 a) J. Biol. -
Chem. 249, (En prensa).

PARRILLA, R., TOEWS, C.J. (1974 b) Amer. J. Physiol. (En -
prensa).

PARRILLA, R., y TOEWS, N. (1974 a) Amer. J. Physiol. (En
Prensa).

PARRILLA, R., TOEWS, C.J., y GOODMAN, M.N. (1972) Diabetes
21, 52.

PASSONNEAU, J.V. y LOWRY, O.H. (1964) Advan. Enzyme Regul.
2, 265-274.

PFLEIDERER, G. (1963) En "Methods of Enzymatic Analysis"
(ed. Bergmeyer, H.V.) Academic Press, New York,
pp. 381-383.

PRIGGE, W.F. y GRANDE, F. (1971) Comp. Bioch. Physiol. -
39 B, 69-82.

RODBELL, M., y JONES, A.B. (1966) J. Biol. Chem. 241, 140-
142.

ROLLESTON, F.S., Tesis Doctoral, Universidad de Oxford, 1966.

ROSS, B.D., HEMS, R. y KREBS, H.A. (1967) Biochem. J. 102,
942-951.

SALASKIN, S. (1898) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 25,

128-151.

- SALTER, J.M., DAVIDSON , I.W.F., y BEST, C.U. (1957) Diabetes 6, 248-255.
- SAMOLS, E. (1965) En "The Nature and Treatment of Diabetes" (ed. LEIBEL, S.A. y WRENSHALL, G,A., Excerpta Medica Foundation) Amsterdam, pp. 227-246.
- SAMOLS, E., TYLER, J.M., y KAJINUMA, H. (1971) En Proceedings VII th International Diabetes Federation Congress, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- SAMOLS, E., TYLER, J.M., MARKS, V. y MIALHE, P. (1969) En "Progress in Endocrinology" ed. C. Gual, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pp. 206-219.
- SCHIMASSEK, H., y MITZKAT, M.J. (1963) Biochem. Z 337, 510-518.
- SCHOLZ, R. (1968) En "3rd Konferenz für Gesamte Biologie und chemie" (eds. STAIB, W. y SCHOLZ, R.) Springer-Verlog, Berlin, pp.25.
- SCHOLZ, R. y BÜCHER, Th. (1965) En "Control of Energy Metabolism" (eds. CHANCE, B., ESTABROOK, R.W. y WILLIAMSON, J.R.) Academic Press, New York, p.393.
- SCIAN, L.F., WESTERMANN, C,D., VERDESCA, A.S. y HILTON,J.B. (1960) Am. J. Physiol. 189, 867-870.
- SCRUTTON, M.C. y UTTER, M.F., Ann. Rev. Biochem. (1968) 37, 249.
- SHOEMAERKER, W.C. y FINDER, A.G. (1961) Proc.Soc. Exp.Biol. (N.Y.) 108, 248-252.

- STAUB, A., SINN, L. y BEHRENS, O.K. (1953) Science, 117, 628-629.
- STAUB, A., SINN, L. y BEHRENS, O.K. (1955) J. Biol. Chem. 214, 619-632.
- STEIMBERG, D.M., SHAFRIR, E. y VAUGHAN, M. (1959) Clin. - Res. 7, 250.
- SUTHERLAND, E.W. (1950) Recent. Progr. Hormone, Res. 5, - 441, 462.
- SUTHERLAND, E. W. y ROBINSON, G.A. (1969) Diabetes 18, 797-819.
- SUTHERLAND, E. W., ROBINSON, G.A. y BUTCHER, R.W. (1968) Circulation, 37, 279-306.
- TAKETA, K. y POGELL, B.M. (1965) J. Biol. Chem. 240, 651 - 662.
- TYBERGHEIM, J. (1953) Arch. Intern. Physiol. 61, 104-107.
- TOEWS, C.S., LOWRY, C. y RUDERMAN, N.B. (1970) J. Biol. - Chem. 245, 818-824.
- UNGER, R. H., AGUILAR-PARADA, E., MÜLLER, W.A. y EISENTRAUT, A.M. (1970) J. Clin. Invest. 49, 837-848.
- UNGER, R.H., EISENTRAUT, A.M., MC CALL, M.S. y MADISON, L.L. (1962) J. Clin. Invest. 42, 682-689.
- UTTER, M.F., KEECH, D.B. y SCRUTTON, M.L. (1964) Adran. - Enzyme Regul. 2, 49-68.
- UTTER, M.F. y SCRUTTON, M.C. (1969) En "Current Topics in Cellular Regulation" (eds. Hoerecker, B.L. y Stadtman) Vol. 1. Academic Press. New York. pp. 253.

- VEECH, R.L., RAIJMAN, L., y KREBS, H.A. (1970) Biochem. J. 117, 499-503.
- VENEZIALE, C.M. (1971) Biochemistry 10, 3443-3447.
- VENEZIALE, C.M. (1972) Diabetes, 21, Suppl. 1, 330-331.
- WEINGES, K.F. y LÖFFLER, G. (1965) Klin. Wschr. 43, 175-176.
- WICKS, W.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3941-3950.
- WICKS, W.D., KENNEY, F.T., y LEE, K.L. (1969) J. Biol. - Chem. 244, 6008-6013.
- WILLIAMSON, D.H., LUND, P., y KREBS, H.A. (1967) Biochem. J. 103, 514.
- WILLIAMSON, D.H., HELLANBY, J. y KREBS, H.A. (1962) Biochem. J. 82, 90-96.
- WILLIAMSON, J.R. (1969) En "Metabolic Regulation and Enzyme Action" (eds. Sols. A y Grisolia S.) Academic Press, New York, pp. 107-113.
- WILLIAMSON, J.R. (1969) En "The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria". (ed. PAPA, S. TAGER, J.M., QUAGLIA; RIELLO, E. y SLATER, E.C.) Adriatica Editrice, Bari pp.385-400.
- WILLIAMSON, J.R., BROWNING, E.T., y OLSON, M.S. (1968) - Advan Enzyme Regul. 6, 67-100.
- WILLIAMSON, J.R., BROWNING, E.T., THURMAN, R.G. y SCHOLZ, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5055-5064.
- WILLIAMSON, J.R., y CORKEY, B.E. (1968) En "Methods in Enzymology" (ed. Lowenstein, J.M.) Vol. 13 Acade -

mic Press, New York, pp. 434-504.

- WILLIAMSON, J.R., SMITH, C. M., LA NOUË, K. F., y BRYLA, J.
(1972) En "Energy Metabolism and the Regulation of
Metabolic Processes in Mitochondria" Academic Press
New York. pp. 185-210.+
- WOLFSON, S.K. Jr. y ELLIS, S. (1956) Proc. Soc. Exp. Biol.
(N.Y.) 91, 226-228.
- WOLLEMBERGER, A., RISTAU, O. y SCHOFFA, G. (1960) Pfluegers
Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere 270, 399-412.
- WOSILAIT, W.D. y SUTHERLAND, E.W. (1956) J. Biol. Chem. 218
469-481.
- WUNSCH, E., JAEGER, E. y SCHARF, R. (1968) Chem. Ber. 101,
3664-3670.
- YOUNG, J.N., SHRAGO, E., y LARDY, H.A. (1964) Biochemistry
3, 1687-1692.